

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**  
**DOUTORADO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

**TESE:**  
**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS BASEADOS EM SPME PARA**  
**A DETERMINAÇÃO DE HERBICIDAS (ALACLOR, ATRAZINA, PROPANIL E**  
**PENDIMETALINA) EM AGUAS SUPERFICIAIS.**

**Léa Luzia Freitas Costa**  
Farmacêutica

Orientador: **Prof. Dr. Ernani Sant'Anna**  
Co-orientador: **Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha**

Tese apresentada como requisito para  
obtenção do título de Doutor em Ciência  
dos Alimentos no Departamento de  
Ciência e Tecnologia de Alimentos da  
Universidade Federal de Santa Catarina

**Florianópolis**  
**Dezembro de 2007**

**Dedico** este trabalho a minha família e em especial ao meu marido Edison, aos meus filhos, Juliana, Alex, Vitor e Aline. E a todos aqueles que em algum momento participaram ou participam, mais ou menos intensamente, da minha vida e que de alguma forma colaboraram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, dentre estes, principalmente aqueles que eu tenho o orgulho de chamar de amigo.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela presença constante na minha vida.
- À minha família que me apoiou de todas as maneiras e concepções em todas as etapas da minha vida.
- São inúmeras as pessoas que me apoiaram e ajudaram na realização dessa tese de doutorado, professores desta universidade, colegas do curso de pós-graduação de Ciências dos Alimentos da UFSC e aos funcionários e colegas do Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina/LACEN.
- À Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade que me concedeu de realizar este trabalho.
- Ao LACEN por propiciar condições de alcançar este momento, em especial o Sr. *Winston Luiz Zomkowski*, Superintendente de vigilância em Saúde de Santa Catarina.
- Sinceros agradecimentos ao meu orientador, professor Dr. Ernani Sebastião Sant'Ana.
- Ao Professor. Dr. Eduardo Carasek da Rocha, Sinceros agradecimentos pela Co-orientação.

- À minha querida amiga Eliane Aparecida Suchara pela amizade sincera, ensinamentos e inestimável ajuda desde o início do trabalho.
- Ao professor Hamad (*in memoriam*) pelos momentos de convivência.
- À Doutoranda Vanira Silva Benato, pela amizade e convivência.
- Aos amigos do LACEN, Beto, Mônica, Ivandir, Paulo César (PC), Maura e Wilson.
- Aos meus queridos amigos, Elza, Regina, Mauro, Eliane, Eunice, Mathias, Sérgio, Jaciara, Sônia e Maria.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABREVIACÕES.....</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>05</b>
2.1 Pesticida.....	05
2.1.1 Histórico.....	06
2.1.2 Classificação dos pesticidas.....	09
2.1.2.1 Características dos pesticidas.....	09
2.1.3 Herbicidas.....	12
2.1.3.1 Herbicidas estudados.....	13
2.2 Contaminação das águas por pesticidas.....	19
2.2.1 Ocorrência de herbicida em água.....	20
2.3 Legislação para água.....	22
2.4 Características ambientais.....	23
2.5 Métodos cromatográficos.....	31
2.6 Métodos de preparo de amostra.....	35
2.6.1 Microextração em fase sólida.....	38
2.7 Validação de métodos.....	51
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>58</b>
3.1 Objetivo geral.....	58
3.2 Objetivos específicos.....	58
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
4.1 Material.....	59
4.1.1 Reagentes e solventes.....	59
4.1.2 Padrões.....	59
4.1.3 Equipamentos.....	59
4.1.4 Material para microextração em fase sólida.....	59
4.2 Método.....	60

4.2.1 Preparo das soluções padrão.....	60
4.2.2 Condições cromatográficas.....	60
4.2.3 Otimização da metodologia.....	61
4.2.3.1 Otimização das condições de extração para os Herbicidas alaclor, atrazina e propanil.....	61
4.2.3.2 Otimização das condições de extração para o Herbicida Pendimetalina.....	62
4.2.4 Metodologia analítica.....	63
4.2.4.1 Extração e determinação dos herbicidas.....	65
4.2.5 Validação dos métodos para extração dos herbicidas.....	65
4.2.5.1 Herbicidas alaclor, atrazina e propanil.....	65
4.2.5.2 Herbicida pendimetalina.....	66
4.2.6 Amostragem.....	66
4.2.6.1 Locais de amostragem.....	67
4.2.6.2 Procedimento de coleta.....	67
<b>5 RESULTADO E DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>5.1 DETERMINAÇÃO DE HERBICIDAS USADOS NO CULTIVO DE ARROZ IRRIGADO NA REGIÃO SUL DO ESTADO DE SANTA CATARINA ATRAVÉS DA SPME-GC-ECD.....</b>	<b>68</b>
5.1.1 Otimização do procedimento de SPME .....	68
5.1.1.1 Tipo de fibra.....	68
5.1.1.2 Modo de extração.....	69
5.1.1.3 Influência do pH.....	71
5.1.1.4 Influência da adição de sal.....	72
5.1.1.5 Velocidade de agitação da amostra.....	73
5.1.1.6 Temperatura da amostra.....	73
5.1.1.7 Volume da amostra.....	75
5.1.1.8 Tempo de extração.....	76
5.1.1.9 Efeito de memória.....	77
5.1.2 Validação da metodologia.....	78
5.1.3 Amostras coletadas nos rios.....	83
<b>5.2 DETECÇÃO DE PENDIMETALINA POR SPME-GC-ECD EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DE RIOS, PRÓXIMOS DAS CULTURAS DE ARROZ</b>	

<b>IRRIGADO .....</b>	<b>92</b>
5.2.1 Otimização do procedimento de SPME.....	92
5.2.1.1 Natureza da fibra.....	93
5.2.1.2 Modo de extração.....	94
5.2.1.3 Influência do pH.....	94
5.2.1.4 Influência da adição de sal.....	95
5.2.1.5 Velocidade de agitação da amostra.....	96
5.2.1.6 Temperatura da amostra.....	97
5.2.1.7 Volume da amostra.....	98
5.1.1.8 Tempo de extração.....	99
5.1.1.9 Tempo de dessorção.....	100
5.2.2 Validação da metodologia.....	101
5.2.3 Amostras coletadas.....	104
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>109</b>
<b>7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>110</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Estrutura química dos herbicidas estudados.....	17
<b>Figura 2:</b>	Mapa de Santa Catarina.....	26
<b>Figura 3:</b>	(A) curso do rio pela cidade de Turvo (Google Earth); (B) Rio Amola Faca.....	27
<b>Figura 4:</b>	(A) curso do rio próximo à cidade de Meleiro (Google Earth); (B) Rio Jundiá.....	28
<b>Figura 5:</b>	(A) curso do rio próximo à cidade de Meleiro (Google Earth); (B) Rio Itoupava.....	29
<b>Figura 6:</b>	(A) curso do rio passando pela cidade de Meleiro (Google Earth); (B) Rio Manoel Alves.....	30
<b>Figura 7:</b>	Dispositivo da fibra de SPME com a fibra retraída.....	39
<b>Figura 8:</b>	Amostrador de SPME: A) amostrador com a fibra exposta; B) amostrados com a fibra retraída.....	40
<b>Figura 9:</b>	Extração no modo direto e dessorção por SPME. (1) perfuração do septo com a agulha; (2) exposição da fibra de SPME diretamente na amostra líquida; (3) após um determinado tempo de extração; (4) recolhe-se a fibra e remove-se do frasco de amostra; (5) agulha introduzida no injetor aquecido do GC; (6) fibra exposta ao injetor (analitos dessorvidos termicamente) e (7) fibra recolhida e agulha retirada do injetor (analitos arrastados para a coluna).....	41
<b>Figura 10:</b>	Modo de extração na SPME: A) modo headspace; B) modo direto.....	44
<b>Figura 11:</b>	Fluxograma da metodologia analítica para a determinação dos herbicidas.....	64
<b>Figura 12:</b>	Resultado obtido da otimização do tipo de fibra.....	70
<b>Figura 13:</b>	Resultados obtido da otimização do modo de extração.....	70
<b>Figura 14:</b>	Resultado obtido da otimização do pH da amostra.....	71
<b>Figura 15:</b>	Resultado obtido da otimização da influência da concentração salina na extração da amostra.....	72
<b>Figura 16:</b>	Resultado obtido da otimização da velocidade de agitação da	



amostra.....	73
<b>Figura 17:</b> Resultado obtido da otimização da temperatura de extração da amostra.....	75
<b>Figura 18:</b> Resultado obtido da otimização do volume da amostra.....	76
<b>Figura 19:</b> Resultado obtido da otimização do tempo de extração da amostra.....	77
<b>Figura 20</b> Linearidade obtida para os herbicidas: (A) alaclor; (B) atrazina e (C) propanil.....	79
<b>Figura 21:</b> Concentrações encontradas de (A) alaclor (B) propanil em cada coleta realizada por rio e mês: Fevereiro (0), Março (30), Abril (60), Maio(90) de 2007 .....	85
<b>Figura 22:</b> Porcentagem das amostras detectadas e não detectadas de propanil para os quatro rios estudados .....	86
<b>Figura 23:</b> Concentrações médias de (A) Alaclor e (B) propanil por rio e coleta realizada.....	87
<b>Figura 24:</b> Concentração média encontrada por coleta realizada: (A) alaclor e (B) propanil.....	90
<b>Figura 25:</b> Resultado obtido da otimização do tipo de fibra para a extração da pendimetalina.....	93
<b>Figura 26:</b> Resultados obtidos da otimização do modo de extração.....	94
<b>Figura 27:</b> Resultado obtidos da otimização do pH da amostra.....	95
<b>Figura 28:</b> Resultado obtidos da otimização da influência da concentração salina na extração da amostra.....	96
<b>Figura 29:</b> Resultado obtido da otimização para velocidade de agitação da amostra.....	97
<b>Figura 30:</b> Resultado obtido da otimização da temperatura de extração da amostra.....	98
<b>Figura 31:</b> Resultado obtido da otimização do volume da amostra.....	99
<b>Figura 32:</b> Resultado obtido da otimização do tempo de extração da amostra.....	100
<b>Figura 33:</b> Curva analítica obtida para o herbicida pendimetalina.....	102
<b>Figura 34:</b> Porcentagem das amostras detectadas e amostras não detectadas por pendimetalina para os quatro rios estudados.....	106

<b>Figura 35:</b> Distribuição das concentrações de pendimetalina em cada coleta realizada por rio: Fevereiro (0), Março (30), Abril (60) e Maio (90) de 2007, .....	107
<b>Figura 36:</b> Concentrações medias de pendimetalina por rio e coleta realizada nos meses de: Fevereiro (0), Março (30), Abril (60) e Maio (90) de 2007.....	107
<b>Figura 37:</b> Concentração media encontrada de pendimetalina por coleta realizada nos meses de: Fevereiro (0), Março (30), Abril (60), maio (90) de 2007, .....	108

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Características físico-químicas dos herbicidas estudados.....	18
<b>Tabela 2:</b>	Tipos de fibras comercializadas para o uso em SPME.....	43
<b>Tabela 3:</b>	Revisão Bibliográfica sobre análise de herbicida em água por SPME.....	48
<b>Tabela 4:</b>	Parâmetros de validação do INMETRO e ANVISA.....	53
<b>Tabela 5:</b>	Variáveis e níveis para otimização univariada da metodologia para os herbicidas alaclor, atrazina e propanil.....	62
<b>Tabela 6:</b>	Variáveis e níveis estudados para otimização da pendimetalina.....	63
<b>Tabela 7:</b>	Número de amostras nos quatro rios estudados para a pendimetalina.....	67
<b>Tabela 8:</b>	Porcentagem de resíduos que permanecem na fibra após os três tempos de dessorção testados.....	78
<b>Tabela 9:</b>	Recuperação dos herbicidas em água destilada para o método proposto.....	82
<b>Tabela 10:</b>	Número de amostras coletadas e amostras contaminadas por rio com os herbicidas alaclor, atrazina e propanil.....	83
<b>Tabela 11:</b>	Valores de recuperação (%) obtidos através de SPME em amostras de água de rio e água de torneira.....	103
<b>Tabela 12:</b>	Número de amostras detectadas e não detectadas com pendimetalina por rio estudado.....	104

**ABREVIACÕES**

- ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CAS:** Número de Registro no Chemical Abstracts Service
- CONAMA:** Conselho Nacional de Meio Ambiente
- CCPR:** Comitê de Resíduos Pesticidas em Alimentos
- EC:** Do inglês “European Community”  
Comunidade Européia
- GC:** Do inglês “Gas chromatography”  
Cromatografia gasosa
- GC-MS:** Do inglês “Gas chromatography – mass spectrometry”  
Cromatografia gasosa - Detetor de massa
- HPLC:** Do inglês “High Performance Liquid Chromatography”  
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CAR/PDMS:** Do inglês “Carboxen/Polydimethylsiloxane”  
Carboxen/ Polidimetilsiloxano
- CW/DVB:** Do inglês “Carbowax/Divenylbenzene”  
Carbowax/Divenilbenzeno
- LC:** Do inglês: “Liquid Chromatography”  
Cromatografia Líquida
- LC-MS:** Do inglês “Liquid Chromatography - mass spectrometry”  
Cromatografia Líquida – Detetor de massa
- FID:** Do inglês “Flame Ionization Detector”  
Detector por Ionização em Chama
- DI-SPME:** Do inglês “Direct Imersion-Solid Phase Microextraction”  
Microextração em fase-sólida por imersão direta
- DPR (RSD):** Desvio padrão relativo
- ECD:** Do inglês “Electron capture detector”  
Detector por Captura de Elétrons
- TCD:** Do inglês “Thermal Conductivity Detection”  
Detector de condutividade térmica
- LLE:** Do inglês “Liquid-Liquid extraction”  
Extração líquido-líquido
- EPA:** Do inglês “Environmental Protection Agency in the United States”  
Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

**SPE:** Do inglês “Solid-phase Extraction”

Extração em fase sólida

**FAO/ WHO:** Do inglês “Food and Agricultural Organization of the United

Nations/World Health organization”

Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentos/

Organização Mundial da Saúde

**HS-SPME:** Do Inglês “Headspace – Solid Phase Microextraction”

Microextração em fase-sólida com amostragem no “headspace”

**HS:** Do Inglês “Headspace”

Espaço confinante

**IBAMA:** Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

**IDA:** Ingestão Diária Aceitável

**INMETRO:** Instituto Nacional de Metrologia

**LOD:** Limite de detecção

**LOQ:** Limite de quantificação

**LMR:** Limite Máximo de Resíduo

**MS:** Do inglês “Mass Spectrometry”

Espectrometria de massa

**MAC:** Do Inglês “Maximum Admissible Concentration”

Concentração máxima tolerável

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PDMS:** Do inglês “Polydimethylsiloxane”

Polidimetilsiloxano

**PA:** Do inglês “Polyacrylate”

Poliacrilato

**R<sup>2</sup>:** Coeficiente de correlação

**SIM:** Do inglês “Selected Ion Monitoring”

Monitoramento de um íon selecionado

**SPME:** Do inglês “Solid Phase Micro-extraction”

Micro-extração em fase sólida

**USDA:** Do Inglês “United State Department of Agriculture”

Departamento da Agricultura dos Estados Unidos

**WHO:** Do inglês: “World Health Organization”

Organização Mundial de Saúde

**Desenvolvimento de métodos analíticos baseados em SPME para a determinação de herbicidas (alaclor, atrazina, propanil e pendimetalina) em águas superficiais.**

**RESUMO**

O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de duas metodologias analíticas baseadas na técnica de microextração em fase sólida (SPME-GC-ECD), a) multiresíduo para alaclor, atrazina e propanil e b) para o herbicida pendimetalina; e aplicar em amostras de águas superficiais dos rios de Turvo e Meleiro na região sul do estado de Santa Catarina. As metodologias foram realizadas de modo univariado, as fibras utilizadas foram de poliacrilato (PA) e polidimetilsiloxano (PDMS, 100  $\mu\text{m}$ ), modo de extração direto, o pH ajustado para 4,0 e 8,0 a velocidade de agitação da amostra 750 g, concentração salina 10% e sem adição de sal, temperatura 70°C e o volume da amostra 15 mL, tempo de extração 40 minutos para as duas metodologias respectivamente. Os limites de detecção (LOD) obtidos para o método de multiresíduo foram de 0,002, 0,02 e 0,005  $\mu\text{g L}^{-1}$  e quantificação (LOQ) de 0,07, 0,06 e 0,016  $\mu\text{g L}^{-1}$  para alaclor, atrazina e propanil, respectivamente. As recuperações variaram de 75,4  $\pm$  18,1 a 116,9  $\pm$  17,3%, para o Alaclor, de 76,1  $\pm$  6,7 a 106,7  $\pm$  14,3% para atrazina e de 96,2  $\pm$  19,2 a 103,9  $\pm$  21,2% para o propanil. O herbicida pendimetalina os valores encontrados de LOD e LOQ foram de 0,02 e 0,06  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. As recuperações foram na faixa de 86,2  $\pm$  11,5% e 103,4  $\pm$  9,5%. As metodologias desenvolvidas foram aplicadas em 82 amostras coletadas de águas superficiais dos rios pesquisados. O alaclor estava presente em 100% das amostras analisadas e os teores encontrados ficaram na faixa de 0,07 a 1,72  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; e 80% das amostras estavam contaminadas pelo propanil com teores de 0,02 até 1,69  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Nenhuma das amostras analisadas apresentou contaminação por atrazina. A pendimetalina estava presente em 53 amostras analisadas, e os teores variaram de 0,06 a 0,38  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

**Palavras chave:** SPME, herbicidas, águas superficiais, GC-ECD.

## **Development of analytical methods based in SPME for the determination of herbicides (alachlor, atrazin, propanil and pendimethalin) in superficial waters**

### **ABSTRACT**

The objective of the present work was development two analytical methodologies based in the technique of microextraction in solid phase (SPME-GC-ECD): a) multiresidue for alachlor, atrazin and propanil and, b) pendimethalin herbicide; both to apply in superficial water samples of the rivers of Turvo and Meleiro from south region of the state of Santa Catarina. The methodologies were done in one-variate way, for the two methodologies were used fibres of polyacrylate (PA, 85 $\mu$ m) and polydimethylsiloxane (PDMS, 100 $\mu$ m), direct way of extration, the pH adjusted for 4.0 and 8.0, the speed of agitation of the sample 750 g, saline concentration 10% and without salt addition, temperature 70°C and the volume of the sample 15 mL, extration time 40 minutes. The limits of detection (LOD) for the multiresidue method were of 0, 002, 0.02 and 0.005  $\mu$ g L<sup>-1</sup> and quantification (LOQ) of 0, 07, 0.06 and 0.016  $\mu$ g L<sup>-1</sup> for alachlor, atrazin and propanil, respectively. The recoveries varied of 75.4  $\pm$  18.1 to 116.9  $\pm$  17.3%, for the alachlor, of 76.1 $\pm$ 6.7 to 106.7 $\pm$ 14.3% for atrazin and of 96.2  $\pm$  19.2 to 103.9  $\pm$  21.2% for the propanil. In the pedimenthalin herbicide the found values of LOD and LOQ were of 0.02 and 0.06  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, respectively. The recoveries were in the band of 86.2 $\pm$ 11.5% and 103.4 $\pm$ 9.5%. The developments methods were applied in 82 collected samples of superficial water of the rivers. The alachlor was presented in 100% of the analyzed samples and the found contents were in the band of 0.07 to 1.72  $\mu$ g L<sup>-1</sup>; and 80% of the samples were contaminated for propanil with values of 0.02 to 1.69  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. None of the analyzed samples were contamination for atrazin. The pendimethalin was presented in 53 analyzed samples and the values varied of 0.06 to 0.38  $\mu$ g L<sup>-1</sup>.

**Key Words:** SPME, herbicides, superficiais waters, GC-ECD.

## 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define “pesticida” como toda substância capaz de controlar uma praga em seu sentido amplo, que possa oferecer risco ou incomodo às populações e ao ambiente. Calcula-se que atualmente existam cerca de 1500 substâncias diferentes com ação pesticida (ingredientes ativos) em todo o mundo, a partir das quais são produzidas inúmeras formulações. No Brasil, mais de 300 princípios ativos incluídos em mais de 2000 produtos comerciais diferentes registrados para o uso agrícola, em sua maioria, uso domissanitário e uns poucos em Saúde Pública (SUCEN, 2007).

Os pesticidas são empregados desde a antiguidade e surgiram com a necessidade de se protegerem as colheitas dos ataques de insetos, que a cada ano comprometiam uma parcela maior da produção (MORASSO et al.2000). Com o passar do tempo os pesticidas foram se tornando mais necessários, a fim de atender à demanda crescente de alimentos. Com a evolução da ciência, surgiram os primeiros produtos sintéticos (ETO, 1977).

A partir da década de 40, apareceria uma primeira classe de pesticidas reunindo características fantásticas. Em baixas doses, resultavam em ação rápida e longo efeito residual, com vantagens de serem menos tóxicos para o homem do que os demais pesticidas disponíveis (SUCEN, 2007). O lançamento do Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT) significava para muitos uma revolução no controle de pragas e seria responsável, juntamente com os adubos químicos, pelo suposto milagre da agricultura com safras recordes e produção em solos praticamente estéreis. Enquanto em todo mundo ampliava-se o uso do DDT, surgiram outros pesticidas



organoclorados cada vez mais eficientes, de longo efeito residual e com doses ainda menores de aplicação (ETO, 1977; SUCEN, 2007).

Outro problema que começava a ser discutido era da persistência dos pesticidas organoclorados nos organismos vivos. Descobriu-se que estes pesticidas não eram metabolizados pelos animais, ficando acumulado por anos nos tecidos. Vestígios de DDT foram encontrados em animais que viviam em locais onde nunca foi aplicado, mostrando que o mesmo entra na cadeia alimentar, contaminando a fauna de maneira irreversível e em curto prazo (ETO, 1977).

A partir da década de 50, surgiram novas classes de pesticidas que passariam a ocupar, nos anos seguintes, o lugar dos organoclorados, pois pesadas doses destes já não conseguiam controlar os insetos em diversas partes do mundo, configurando o que viria a ser chamado de resistência. As pesquisas continuavam e novos compostos surgiam a cada ano. Na década de 70 nasciam os piretróides, produtos sintéticos análogos aos componentes obtidos a partir de substâncias vegetais. Estudavam também métodos de aplicação mais apropriados e uma política de uso racional dos pesticidas que respeitasse o ambiente (SUCEN, 2007).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) o Brasil foi apontado como um dos países que mais exagera na aplicação de pesticidas na lavoura. O uso intenso de pesticida associado à grande variedade de substâncias existentes, indica que os riscos para a saúde e ambiente correlacionados com o uso de pesticidas no Brasil não devem ser negligenciados e devem ser estudados mais intensamente.

A região sul Catarinense é abastecida pela bacia hidrográfica do rio Araranguá e seus principais afluentes são: rio Manoel Alves, rio Amola-Faca, rio Itoupava e rio Jundiá. Estes rios têm uma vital importância para região sul de Santa

Catarina, pois banham as áreas agriculturáveis localizadas em suas margens, beneficiando os rizicultores de todo vale, além de contribuir para outras culturas, pecuária, pesca turismo, bem como o abastecimento de água potável para os habitantes da região.

Tanto no Estado de Santa Catarina, quanto no Rio Grande do Sul, produtores de arroz irrigado adotam a prática da rizipiscicultura que poderia ser diretamente afetada pela utilização desses produtos (PRIMEL, 2005). Durante as etapas iniciais de desenvolvimento da rizipiscicultura pode haver necessidade do uso de herbicidas para o controle de algumas espécies de plantas daninhas, especialmente aquáticas (PRIMEL, 2005).

No entanto, existe a preocupação em relação ao uso indiscriminado dos herbicidas, que após aplicação, podem ser absorvidos pelas argilas contidas no solo, ou quando ali depositados permanecem expostos às inúmeras reações químicas, físicas e biológicas (RIBEIRO, 2007).

Quando pesticidas são encontrados em águas, normalmente, não estão presentes em concentrações suficientemente altas para causar efeito agudo à saúde. A preocupação principal torna-se então, seu potencial de causar problemas crônicos à saúde. Limites para concentrações de pesticidas em água potável têm sido estabelecidos por agências tais como a OMS e o Ministério da Saúde, objetivando proteger a saúde humana.

Devido ao grande número de princípios ativos utilizados na agricultura, as análises exigem métodos de multi-resíduos eficientes e capazes de detectar limites máximos de resíduos estabelecidos por legislação (LMR) e concentrações consideradas de alerta para saúde humana. (RIBEIRO et al., 2007). Em pleno século 21, muitos laboratórios ainda estão utilizando técnicas de preparação e

determinação da década de 80, estes métodos apresentam algumas limitações como o elevado consumo de tempo, pequena possibilidade de mecanização, perda do analito durante o processo de concentração e emprego de solventes (LANÇAS, 2004; OLIVARES, 2006).

Com a implantação do programa da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USA), que apresenta alternativa visando à redução de solventes tóxicos e eliminação de clorofluorcarbonos (CFC) (U.S.EPA, 1991), Percebe-se uma preocupação da comunidade científica no desenvolvimento de técnicas que utilizem pouca quantidade de solvente, ou, ainda, de técnicas que dispensem o uso dos mesmos.

A microextração em fase sólida é uma técnica de extração e pré-concentração rápida, simples e que dispensa o uso de solventes extratores e manipulação excessiva de amostra. Esta técnica foi descrita por ARTHUR e PAWLISZYN, (1990), no início da década de 90 e tem sido extensivamente estudada e aplicada em diversas matrizes como alternativa às metodologias tradicionais AUGUSTO e VALENTE (2002).

Considerando as vantagens em substituir as técnicas tradicionais utilizadas para análises de pesticidas, este trabalho teve como objetivo desenvolver métodos analíticos usando a técnica de microextração em fase sólida, por cromatografia gasosa, como um método alternativo para determinação dos herbicidas alaclor, atrazina, propanil e pendimetalina em amostras de água superficiais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PESTICIDA

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define que os pesticidas são “qualquer substância utilizada com a finalidade de prevenir, destruir ou repelir, direta ou indiretamente, qualquer forma de agente patogênico ou de vida animal ou vegetal, que seja nociva às plantas e animais úteis, seus produtos e subprodutos e ao homem” (PERES e MOREIRA, 2003). A OMS enquadra dentro do conceito de pesticida as substâncias capazes de controlar uma praga em seu sentido amplo, e que não ofereça nenhum risco ou incômodo às populações e ao ambiente.

Os pesticidas incluem uma enorme variedade de compostos químicos que divergem entre si não apenas estruturalmente, mas pelo modo de ação, metabolismo e toxicidade para humanos (MORASSO et al., 2000). Vários são os termos aplicados para conceituá-los: pesticidas, agrotóxicos, fitofarmacêuticos, defensivos agrícolas, praguicidas, desinfetantes, entre outros (SUCEN, 2007).

Embora o termo “pesticida” seja semanticamente questionado por ser uma adaptação do termo inglês “pesticide”, ele continua sendo amplamente utilizado. O pesticida engloba um número maior de produtos, como os fertilizantes e adubos inorgânicos, portanto, não representa o real sentido do termo agrotóxico, que indica não apenas a sua finalidade de uso, mas também o caráter prejudicial destas substâncias, visualizado no radical “tóxico” (PERES e MOREIRA, 2003). Desta forma o termo pesticida será usado também neste trabalho.

### 2.1.1 Histórico

A grande maioria dos compostos químicos usados como pesticidas foi desenvolvida na década de 30 do século XX. O pesticida organoclorado DDT foi desenvolvido em 1939 e foi muito usado em programas de saúde pública. Porém, a degradabilidade e o modo de dispersão deste pesticida tornaram-se grandes problemas para o ambiente e a saúde, levando-o a ser proibido comercialmente nos Estados Unidos em 1972 (ETO, 1977), e nove anos depois no Brasil.

No Brasil, a década de 70 foi à época de grande expansão da produção e do uso de pesticidas, em razão dos incentivos para produção agrícola e a política de exportação. Desde então, com a expansão no mundo agrícola, dirigida pelo aumento de níveis populacionais, a pesquisa de novos pesticidas tem crescido consideravelmente (LARA et al., 1992; PRIMEL et al., 2005).

Estima-se que aproximadamente 1500 substâncias diferentes, apresentam ação pesticida no mundo, e que dão origem a milhares de formulações (SUCEN, 2007). Estes pesticidas podem ser classificados de diferentes formas: de acordo com a finalidade, tipo de praga a que se destina quanto ao modo de ação toxicidade, duração, dentre outros.

Desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada com a aplicação de pesticidas para controlar pragas que atacam os produtos agrícolas, prejudicando as colheitas. A aplicação de pesticidas gera, comumente, grandes problemas; ou seja, os pesticidas muitas vezes são tóxicos, podendo ser cancerígenos, mutagênicos e mimetizadores de hormônios (PRIMEL et al., 2005).

Podemos observar que ao longo dos anos, o uso indiscriminado dos pesticidas tem levado ao aparecimento de resíduos desses compostos nos diferentes compartimentos do meio ambiente (água, solo e ar) e em produtos alimentícios (PRIMEL et al., 2005). Diante desse fato e da periculosidade que os pesticidas apresentam à saúde humana e à manutenção da biodiversidade, há hoje uma necessidade urgente de se intensificarem os estudos que possibilitem um monitoramento eficiente de possíveis contaminações do ambiente. Estes estudos são fundamentais para que se estabeleçam estratégias visando à redução dos riscos de contaminação (RIBEIRO et al., 2007).

A entrada de pesticida no meio aquático a partir do uso agrícola depende, em grande parte, da dinâmica destes compostos no solo uma vez que além do carreamento pela ação dos ventos com posterior precipitação, a movimentação dos pesticidas a partir do solo contribui de forma significativa para sua chegada no meio aquático (ISENSEE, 1991). Apesar da porcentagem do pesticida aplicado no campo que é perdida por carreamento ser pequena, esta representa, provavelmente, a rota principal através da qual os pesticidas agrícolas atingem rios e lagos (BROWER, 1995). Segundo WAUCHOPE (1996), o carreamento superficial, quando ocorrem poucos dias após a aplicação do pesticida, remove em torno de 1% da quantidade presente no solo.

Embora de difícil avaliação, os custos sociais e ambientais decorrentes do uso de pesticidas são altos (GARCIA et al., 2001). A OMS estima que, no mundo, mais de 500 milhões de pessoas se exponham aos pesticidas pelo trabalho agrícola e que ocorram 3 milhões de intoxicações severas, incluindo 1 milhão de casos de intoxicações aguda não intencional. Em uma revisão sobre a quantidade de pesticidas que é aplicada e aquela que efetivamente atinge pragas que se quer

controlar. PIMENTEL e LEVITAN (1991) mencionam que nos Estados Unidos, freqüentemente, menos de 0,1% do produto aplicado atinge seus objetivos.

Estudos no Brasil para monitoramento da presença de resíduos de pesticidas no lençol freático ainda são incipientes. Um amplo monitoramento de resíduos em água do lençol freático, realizado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) em 1988, constataram que 46 pesticidas diferentes foram encontrados no lençol freático de 26 Estados Americanos. No entanto, desses 46 pesticidas, 32 foram encontrados no lençol freático de 12 Estados devido à utilização inadequada, ou seja, violação das restrições contidas nos rótulos dos produtos.

Em 1992, outro monitoramento foi realizado pela EPA, no qual se investigou a presença de resíduos de pesticidas por cinco anos em poços utilizados para o consumo de água pela população de 50 Estados Americanos. Os resultados desse estudo revelaram que 10,4% dos sistemas de água comunitários e 4,2% dos poços da área rural estavam contaminados com a presença de, pelo menos, um pesticida.

LAABS et al. (2002) alertaram para importância do transporte aéreo de pesticidas em ambiente tropical devido às elevadas temperaturas, uma vez que os autores detectaram pelo menos um pesticida em 74% das amostras de água analisadas no Pantanal Mato-grossense, distante das áreas agrícolas.

No cultivo de qualquer sistema agrícola, como por ex., no arroz irrigado em sistema de cultivo pré-gerrminado, o ponto de partida para o desencadeamento de impacto ambiental é a técnica de aplicação do pesticida. As maiores rotas de dispersão de pesticidas para o sistema aquático são os escoamentos superficial e a drenagem. O tipo de planta e a topografia do terreno têm importância decisiva na maioria desses processos. Assim a dinâmica dos pesticidas no solo está

relacionada com a precipitação pluvial e o manejo da irrigação (PRIMEL et al., 2005).

### **2.1.2 Classificação dos pesticidas**

Os pesticidas químicos podem ser classificados quanto a sua origem e são divididos em inorgânicos e orgânicos. Os inorgânicos (chumbo, arsênico e mercúrio) foram utilizados por muito tempo, mas foram substituídos pelos compostos orgânicos por serem biodegradáveis. Os orgânicos são atualmente os principais e se subdividem em: de origem animal (óleos animais), de origem petrolífera (óleos minerais), de origem vegetal (óleos vegetais, nicotina, piretrinas), organo-sintéticos (clorados, fosforados, piretróides, carbamatos etc.). Os organo-sintéticos são os mais usados (ETO, 1977).

#### **2.1.2.1 Características dos Pesticidas**

Os pesticidas organoclorados são de largo usos agrícola e domiciliar, os organoclorados desempenham papel marcante no combate a organismos nocivos ao homem, com repercussões sociais e econômicas importantes. Com o advento de legislações restritivas em muitos países, por sua persistência ambiental, tendência a acumular no organismo e o aumento da resistência dos insetos, diminui-se a sua utilização. No Brasil, o uso dos organoclorados é proibido para uso agrícola, sendo somente autorizado para órgãos públicos responsáveis pelas Campanhas de Saúde. Estrutura molecular: corresponde a dos hidrocarbonetos clorados, ainda que, além do cloro, alguns deles possuam oxigênio. São derivados do



clorobenzeno, do ciclohexano ou do ciclodieno (SUCEN, 2007; LARA, et al., 1999; MOTOLESY et al., 1988).

Persistência/degradação são muito criticados, dada a sua longa persistência no ambiente (até 30 anos no solo) e a acumulação nas cadeias alimentares. Devido à notável resistência ao ataque de microrganismos e à alta estabilidade de grande parte dos organoclorados à ação da luz solar e temperatura ambiente, não são degradados facilmente, o que leva à contaminação do meio, quebrando o equilíbrio biológico. (SUCEN, 2007; LARA, et al., 1999; MOTOLESY et al., 1988). Modo de ação: atuam por ingestão e contato, bloqueando a transmissão dos impulsos nervosos.

Os pesticidas organofosforados possuem uma ampla gama de produtos agrícolas e sanitários, desde os extremamente tóxicos até aqueles de baixa toxicidade, como o temephos, que tem seu uso permitido em água potável. Na área de Saúde tem sido bastante usados, dada a sua eficiência. No entanto, este grupo é responsável pelo grande número de intoxicações e mortes no país (SUCEN, 2007)

Estrutura molecular: são ésteres, amidas ou derivados tiol dos ácidos de fósforo (ácido fosfórico, ácido tiofosfórico, ácido ditiofosfórico e outros), contendo várias combinações de carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre, e nitrogênio. Os organofosforados possuem vários grupos segundo sua estrutura, estando mais numerosos os fosfatos (diclorvos), fosforotioatos (fenitrothion, temephos) e fosforoditioatos (malathion, dimetoato) (SUCEN, 2007).

Persistência/degradação são biodegradáveis, sendo, portanto sua persistência curta no solo, 1 a 3 meses. O principal meio de degradação no ambiente parece ser por hidrólise sob condições de alcalinidade. Modo de ação: é por contato e ingestão. Agem como inibidores das enzimas colinesterases,

causando o aumento dos impulsos nervosos, assim podendo ocasionar a morte (SUCEN, 2007).

Os pesticidas carbamatos são orgânicos derivados do ácido carbâmico. Três classes de carbamatos são conhecidas: carbamatos inseticidas (e nematicidas) carbamatos herbicidas e carbamatos fungicidas. Os carbamatos usados como inseticidas (e nematicidas) são derivados do éster de ácido carbâmico. Persistência/degradação: em geral, são compostos instáveis. Muitos fatores influenciam a degradação dos carbamatos, como a umidade, temperatura, luz, volatilidade. São metabolizados pelos microrganismos, plantas e animais ou degradados na água e no solo, especialmente em meio alcalino. Ocorre decomposição com a formação de amônia, amina, dióxido de carbono, fenol e álcoois. Modo de ação: com ação de contato e ingestão, são igualmente inibidores das enzimas colinesterases, embora por mecanismo diferente dos organofosforados. (SUCEN, 2007).

Os pesticidas piretróides têm sido bastante empregados nas áreas de Saúde e agricultura. Isso decorre devido à alta eficiência, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo, resultando em menor contaminação nas aplicações. Como isso, vem substituindo rapidamente o lugar dos organofosforados. Outras vantagens destes pesticidas é que eles admitem a sinergia, ou seja, a potencialização pela adição sinergista, dando lugar a um aumento da eficácia. (SUCEN, 2007). Estrutura molecular: compostos sintéticos análogos aos componentes obtidos a partir dos piretros, extraídos do crisântemo. Persistência/degradação: os Piretróides sintéticos têm boa estabilidade sob luz e temperatura ambiente. Degradam-se por hidrólise e oxidação, sendo caracterizados também pela rápida degradação por microrganismos do ambiente, não registrando

acumulação de resíduos ou esta alcança níveis não detectáveis. Modo de ação: compostos de mais rápida ação na interferência da transmissão de impulsos nervosos. Podem possuir efeito repelente, espantando os insetos ao invés de eliminá-los (SUCEN, 2007)

### 2.1.3 Herbicidas

Os herbicidas são destinados a eliminar ou impedir o crescimento de ervas daninhas que prejudicam o crescimento de plantas de uma lavoura, normalmente é utilizado para substituir a capina mecânica ou manual. ZAMBOLIM et al. (2003) descreve que os herbicidas são produtos químicos sintéticos, normalmente orgânicos, utilizados para provocar a morte ou inibir o desenvolvimento plantas daninhas. Esta classe representa cerca de 40% do total mundial de vendas de pesticidas (ZAMBOLIM et al., 2003). **Tabela 1.**

Os herbicidas podem ser classificados: quanto à época de aplicação de aplicação com pré-plantio são aplicados antes da planta cultivada; de aplicação com Pré-Plantio Incorporado (PPI) - são aplicados antes do plantio da planta cultivada e são incorporados ao solo por meio do uso de implementos apropriados; herbicidas de aplicação com pré-emergência – são aplicados após o plantio das culturas, antes da emergência das plantas daninhas - estes podem tolerar a falta de umidade do solo devido a características de maior persistência; herbicidas de aplicação com pós-emergência - são aplicados após a emergência das plantas daninhas (ZAMBOLIM et al., 2003).

Quanto à seletividade; os herbicidas são dependentes da dose aplicada e podem ser subdivididos em seletivos aqueles herbicidas que quando usados

controlam as plantas daninhas sem afetar a planta cultivada; não seletivos aqueles que quando em determinadas doses, controlam todas as plantas existentes na área.

Quanto ao grupo químico: com base na estrutura química das moléculas (ZAMBOLIM et al., 2003).

Quanto ao mecanismo de ação: para penetrar na planta e agir causando a morte desta. Para tal necessita ser translocado até o local de ação. A maioria necessita entrar nas células até o cloroplasto. Onde ocorrem as reações que irão inibir o crescimento das plantas. O mecanismo de ação é definido como a primeira reação bioquímica ou biológica que é afetada no interior da célula (ZAMBOLIM et al., 2003).

#### **2.1.3.1 Herbicidas estudados**

Alaclor (2-cloro-2,6-dietil- N(metoximetil acetamida) **Figura 1**. Os herbicidas deste grupo são classificados quanto ao seu modo de ação como sendo “inibidores do crescimento.” no mesmo sentido, são denominados “inibidores da divisão celular (parte aérea)” O alaclor faz parte do grupo das cloroacetamidas (**Tabela 1**), cuja modalidade e efeito residual no solo são dependentes do teor de matéria orgânica e condições de umidade (ZOMBOLIN, 2003).

Herbicida sistêmico e seletivo utilizado no controle pré e pós-emergente de ervas daninhas de folhas largas (SIA, 2007). Embora seu modo de ação ainda seja um pouco obscuro acredita-se que sua ação herbicida esteja centrada na inibição da síntese protéica (JAVARONI et al., 1999). Os herbicidas pertencentes a essa classe de compostos são na sua maioria ácidos, o que confere às suas moléculas um caráter aniônico. Em condições normais de aplicação, sofrem degradação no

solo formando vários metabolitos (JAVARONI et al., 1999). Em sistema aeróbio a interação do alaclor com a matéria orgânica pode ser uma via de dissipação, muito embora, outros processos estejam envolvidos, como por exemplo, a lixiviação.

Atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina), **Figura 1**. Herbicida pré e pós-emergente, é importante representante do grupo das triazinas (**Tabela 1**). Tem sido utilizada no controle anual de plantas daninhas em grande variedade de culturas, incluindo as de milho, cana de açúcar, e pinus. Devido ao uso intenso, baixa reatividade e solubilidade, são comumente detectadas no monitoramento de solos e águas subterrâneas. Seus resíduos e metabolitos podem ser encontrados nesses locais após longo tempo de aplicação, pois seu tempo de vida médio varia de 20 até mais de 100 dias. Seus resíduos também são encontrados em frutas e vegetais (COUTINHO et al., 2005).

A atrazina é altamente persistente no solo. Os processos de hidrólise seguida de biodegradação são os principais mecanismos de degradação. Pode persistir por mais de um ano sobre condições de estiagem e frio. Tende a apresentar mobilidade de média à alta em solos com baixo teor de argila ou matéria orgânica, pois tende a ser mais absorvível a estes materiais (FAO, 2000). Devido aos fatores anteriormente citados, possui meia vida relatada de 60 a mais do que 120 dias, é considerado como composto com alto potencial de contaminação de água subterrânea, mesmo apresentando baixa solubilidade na água. Em função das condições ambientais, a intensidade de degradação depende fortemente da acidez do ambiente e da presença catalisadoras. Pode ser hidrolisada muito rapidamente em ambientes alcalinos ou acidificados, sendo muito resistente a hidrólise em ambientes neutros. A hidrólise em ambientes alcalinos é duas vezes mais rápida do que em ambientes ácidos (FAO, 2000).

Propanil (3',4'-dicloropropionanilina), anilida **Figura 1..** Herbicida seletivo de contato e pós-emergente (derivados das cloroanilidas) (**Tabela 1**) tem sido utilizado intensivamente na cultura de arroz (*Oryza sativa* L.) para o controle de plantas daninhas de folha larga e estreita (MARTINEZ et al., 2005). Com meia vida de aproximadamente 1 ano, sofre clivagem hidrolítica em meio fortemente ácido e alcalino originando 3,4 dicloroanilida (3,4 - DCA) e ácido propiônico. O propanil é estável entre pH 4 e 9 (TOMLIN, 2000).

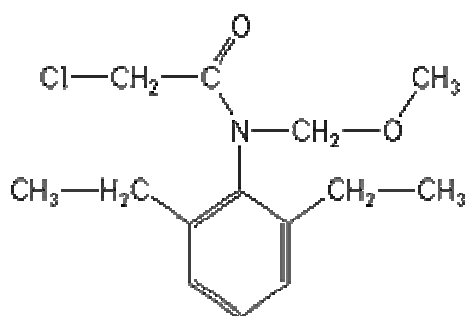
As cloroanilidas adsorvem-se as substâncias húmicas no solo, podendo permanecer ligadas durante anos após a aplicação. Também sujeitas a dimerização e polimerização formando composto azo, altamente estáveis e resistentes a mineralização (MARTINEZ et al., 2005).

Pendimetalina [N-1-(etil propil)-2,6-dinitro-3,4-metil-toluidina], **Figura 1.** Herbicida seletivo, pré e pós-emergente, a pendimetalina é utilizada no controle anual da maioria das gramíneas e de ervas daninhas de folhas largas em culturas de milho, batata, arroz, algodão, soja, tabaco, amendoim e girassol (COUTINHO et al., 2005).

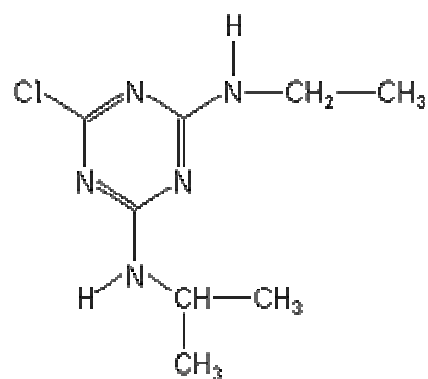
Pendimetalina apresenta afinidade por proteínas chamadas tubulinas. Essas proteínas mediante polimerização constituem os microtúbulos que fazem parte do citoesqueleto (responsável pelo formato tetraédrico das células vegetais). Dinitroanilinas (**Tabela.1**) sofrem foto decomposição, a qual ocorre predominantemente no estado de vapor. Assim compostos mais voláteis são mais fotodegradáveis. Grande número de produtos é esperado da redução da pendimetalina. A redução do grupo nitro segue a progressão nitro→nitroso→hidroxilamina→amina (ARNOLDO, 2004).

A degradação no solo pode ocorrer tanto em condições aeróbias como anaeróbicas. Produtos da degradação desse herbicida, embora não identificados, mostram-se mais polares que a própria pendimetalina. A biodegradação aeróbia ocorre pela desalquilação do grupo amino. Seguido da redução do grupo nitrilo. Já sob condições aeróbias verifica-se a redução seqüencial dos grupos nitro (ARNALDO, 2004).

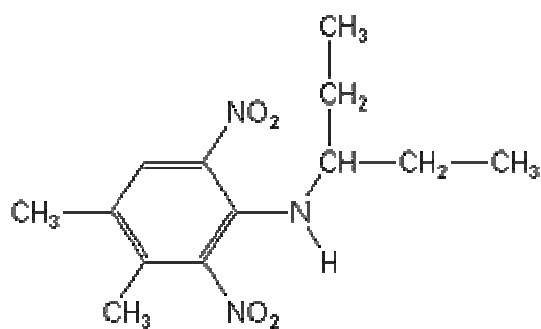
Intoxicação por pendimetalina ocorre pelo ar e pela ingestão de alimentos contaminados, ou simplesmente pelo contato direto com a pele. Levemente tóxico, a inalação de vapores ou de partículas desse pesticida pode ser moderadamente irritante para as mucosas da boca, do nariz, da garganta e dos pulmões (ETN, 2003). A molécula da pendimetalina, absorvida em pequenas quantidades pelo trato gastrointestinal, é eliminada pelas fezes. Pequena quantidade absorvida é rapidamente metabolizada pelo fígado e pelos rins, sendo excretada pela urina na forma de metabólitos. O produto é tóxico para peixe e invertebrados aquáticos. Nos vegetais, a pendimetalina é absorvida pelas raízes da plantas e degradada por oxidação (WSSA, 1994).



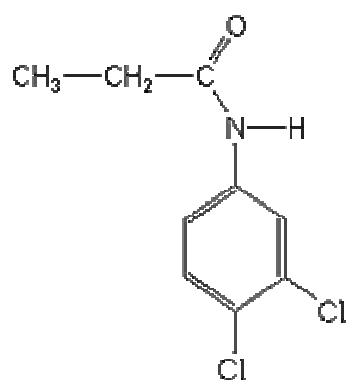
Alaclor



Atrazina



Pendimetalina



Propanil

**Figura 1:** Estrutura química dos herbicidas estudados (SIA, 2007).



**Tabela 1:** Características físico-químicas dos herbicidas estudados

Herbicida	Nome químico	Formula Química	Massa Molar/	CAS	Grupo químico	Classe toxicológica <sup>a</sup>
<b>Alaclor</b>	2-cloro-2,6-dietil- N( metoximetil acetamida	$C_{14}H_{20}ClNO_2$	269,8	15972-60-8	Acetamidas	Classe II
<b>Atrazina</b>	2- cloro-4-(etilamino)-6- (isopropilamino)-s-triazina	$C_8H_{14}ClN_5$	215,7	1912-24-9	Triazina	Classe III
<b>Pendimetalina</b>	[N-1-(etil propil)-2,6-dinitro-3,4- metil-toluidina].	$C_{13}H_{19}N_3O_4$	281,3	40487-42-1	Dinitroanilina	Classe II
<b>Propanil</b>	3', 4'-dicloropropionanilina	$C_9H_9Cl_2NO$	218,1	709-98-8	Anilida	Classe II

Fonte: (SIA, 2007). Classe (II): altamente tóxico (III): medianamente tóxico

## 2.2 CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS POR PESTICIDAS

A água é um dos recursos naturais mais importantes para a vida apresentando usos intensivos e diversificados. Além de ser um componente vital no sistema de sustentação da vida na Terra, também é necessária para dar continuidade ao crescimento econômico das sociedades. Dentre os vários usos, destacam-se o consumo humano, a dessedentação de animais, a irrigação, o cultivo de espécies aquáticas, os processos industriais, a geração de energia, o lazer e a navegação (TUNDISI, 2003). Esses usos dependem dos padrões de qualidade da água dos recursos hídricos, os quais são estabelecidos por normas federais e estaduais.

No entanto, a presença dos pesticidas nas águas potáveis implica considerar-se o caráter da poluição dos mesmos sobre as águas brutas. Essa poluição é apenas um dos aspectos da problemática ambiental das águas em geral. A poluição das águas devida a metais pesados, microrganismos, matérias orgânicas fermentáveis, hidrocarbonetos e outros, poderiam, em grande parte, ser evitada por políticas adequadas (RIBEIRO et al., 2007).

Nessa grande diversidade de poluentes, os pesticidas têm posição particular, porque a sua presença nas águas abrange vários setores da sociedade, incluindo o agrícola e o industrial, como sendo fonte dessa poluição e como consequência, afetando a saúde pública e o meio ambiente (RIBEIRO et al., 2007). Na origem dessa poluição das águas o principal responsável é o setor agrícola, cujas práticas devemos questionar visto que a utilização excessiva dos pesticidas esta associada a uma agricultura intensiva, que produz outros tipos de problemas, como a eutrofização das águas, a queda de biodiversidade e a erosão dos solos.

No Brasil, a situação de poluição dos recursos hídricos apresenta-se de forma bastante diversificada, sendo um reflexo da variabilidade de desenvolvimento sócio-econômico e da disponibilidade hídrica nas regiões (TUNDISI, 1996).

### **2.2.1 Ocorrência de herbicida em água**

CARABIAS-MARTINEZ, et al. (2002) determinaram herbicidas em água de rios (3 pontos) e águas subterrâneas (6 poços) na região de Salamanca na Espanha, no período de outubro de 2000 a janeiro de 2001, total de 6 amostragens. Foram detectados atrazina e seu metabólito DEA em apenas uma amostra de água superficial ( $0,17 \text{ ug L}^{-1}$  de atrazina e  $0,30 \text{ ug L}^{-1}$  de DEA) e, em águas subterrâneas, foram encontrados teores de  $0,76$  a  $1,67 \text{ ug L}^{-1}$  para atrazina e  $0,70$  a  $1,30 \text{ ug L}^{-1}$  para DEA em um poço, durante todo o período. Os autores verificaram que os teores destes herbicidas foram independentes da época de coleta, indicando que a poluição nas águas subterrâneas é persistente e parece estar relacionada com a frequência de aplicação, permeabilidade do solo, frequência de precipitação chuvosa e velocidade de recarga do aquífero.

Durante um monitoramento de pesticidas em águas do Rio Kalamas no período de janeiro a dezembro/2000, LAMBROPOULOU, et al. (2002), detectaram os herbicidas EPTC, DEA, trifluralina, atrazina, terbutilazina, e alaclor em concentrações médias de  $0,02$  e  $0,10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

CARABIAS-MARTINEZ et al. (2003) analisaram água de superfície e de profundidade dos rios da Espanha para determinação de 10 herbicidas, sendo que foi detectada a presença de vários dos herbicidas estudados. No entanto, à atrazina

foi detectada em uma das amostras de água de superfície, e em uma amostra de profundidade, os teores variaram de 0,74 a 0,99  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

CEREJEIRA et al. (2003) analisaram águas superficiais coletadas em três bacias de Portugal no período de 1983 a 1999, inseticidas e herbicidas foram detectados, em particular a atrazina (máximo de 0,18  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). LAMBROPOULOU, et al. (2000), encontraram atrazina em amostras de água do rio Kalamas e os teores de 0,002 a 0,23  $\mu\text{g L}^{-1}$ . KONSTANTINOOU et al. (2006), revisaram os dados publicados sobre ocorrência de pesticidas em águas dos rios, na Grécia no período de 1993 a 2004, dentre as substâncias detectadas, 23% de atrazina e os teores de 0,002 a 0,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

LAABS et al. (2002) em um estudo de monitoramento piloto no nordeste da Bacia do Pantanal, que evidenciou a ocorrência da distribuição de um largo espectro de pesticidas nesta região. Foram investigados 29 pesticidas e 3 metabólitos, dentre os quais 22 foram detectados pelo menos uma vez, levando a uma porcentagem de detecção global de 68% de águas superficiais, 87% em água de chuva e 62% em sedimento de fundo. As concentrações dos pesticidas encontrados em águas superficiais ( $< 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e em sedimentos ( $< 10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) foram geralmente baixas quando comparadas com estudos em regiões temperadas. Os pesticidas detectados com maior frequência e/ou persistência foram as triazinas (atrazina, simazina e ametrina), as acetanilidas (alaclo e metaclo), a trifluralina e o endossulfon.

Estudo realizado em uma região agrícola dos Estados Unidos (ROCHA et al., 2007) em amostras de água de drenagem do rio St. Joseph, no período de Abril a Outubro de 2004 e 2005. Os autores puderam constatar a presença dos herbicidas

atrazina, simazina, alaclor, acetaclor e metaclor, sendo que os limites máximos variaram de 49,3, 10,8, 10,6, 11,4, 22,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

No Brasil, são poucos os estudos que investigaram a ocorrência de pesticidas em águas superficiais. A presença de níveis baixos de pesticidas ou seus produtos de degradação em água, principalmente quando usada para consumo humano, pode trazer conseqüências ainda desconhecidas para saúde. Pouco se conhece sobre os efeitos crônicos destas substâncias para o ser humano e para a vida aquática em geral. Existe ainda muita controvérsia sobre os efeitos dos chamados estrógenos ambientais, dentre os quais se encontra a atrazina, um dos pesticidas mais freqüentemente encontrados em água, sobre o sistema hormonal do ser humano (MCFARLAND, 1996 e HILEMAN, 1994).

## 2.3 LEGISLAÇÃO PARA ÁGUA

Órgãos internacionais como EPA dos Estados Unidos e a EC iniciaram um controle, estabelecendo limites em relação às concentrações de pesticidas encontradas em águas. Além disso, estes órgãos organizam listas de periculosidade de tais compostos. Os níveis permitidos pela EC são determinados pela *Drinking Water Directive* (80/778/EEC), que estabeleceu que a concentração máxima tolerável (*Maximum Admissible Concentration*, MAC) de um pesticida individual não deve exceder 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e que a concentração total de pesticidas não deve exceder 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em água potável.

Através da lei 7.802 de 11 de julho de 1989 (BRASIL, 1998) e da portaria n° 03 de 16 de janeiro de 1992 (BRASIL, 1992) têm-se as diretrizes para a utilização de pesticidas no Brasil. Os Ministérios da Saúde, Agricultura e o Instituto do Meio

Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), cada um na sua área de atuação, ficam responsáveis pela autorização ou não da utilização dos pesticidas no Brasil. Compete aos estados e ao Distrito Federal legislar, bem como fiscalizar sobre o uso, a produção e o consumo, o comércio e o armazenamento dos agrotóxicos e seus componentes afins.

No Brasil, a portaria do Ministério da Saúde nº. 518/GM de 25 de março de 2004, estabelece normas de qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Nesta portaria foram introduzidos limites de novos pesticidas para água de consumo humano baseada em sua periculosidade, similar a EPA. Entretanto, o número destas substâncias na legislação brasileira ainda é muito pequeno comparado com a grande quantidade de ingredientes ativos atualmente em uso. De acordo com esta portaria a concentração máxima permitida para os herbicidas atrazina é de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ , e de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  para alaclor, propanil e pendimetalina.

No Brasil, os limites de contaminantes no ambiente são determinados pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA, 2005), em sua resolução N° 357, de 17 de março de 2005, estabelece limites máximos de contaminantes em águas dependendo de sua destinação; sendo que dentre estes, estão alguns pesticidas organoclorados, organofosforado e carbamatos.

## **2.4 CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS**

A bacia do rio Araranguá encontra-se localizada, no extremo sul catarinense, entre as cga.  $28^{\circ} 30'$  e  $29^{\circ} 20'$  S e  $49^{\circ} 15'$  e  $50^{\circ}$  W. Faz parte do sistema de Vertente do Atlântico e compõe, juntamente com as bacias dos rios Urussanga e Mampituba, a região hidrografia do Extremo sul catarinense (HADILICH, 1997).

O rio Araranguá pode ser ilustrado na cultura de arroz irrigado, em que a grande área cultivada reflete diretamente na disponibilidade dos recursos hídricos. Por outro lado, a escassez de água, quantitativa ou qualitativamente, inibe a expansão da cultura de arroz irrigado, acrescenta-se também o fato que os pesticidas aplicados podem ter sua ação expandida além do cultivo de arroz, contaminando águas fluviais e subterrâneas (PRIMEL, et al., 2005)

Os rios onde foram coletadas as amostras de água para análises dos herbicidas (alaclor, atrazina, propanil e pendimetalina), rios: Amola-Faca (**Figura 3**), Itoupava (**Figura 4**), Jundiá (**Figura 5**) e Manoel Alves (**Figuras 6**). Estes rios estão localizados nos municípios de Turvo e Meleiros, região Sul de Santa Catarina. (**Figura 02**), Distante 234 km de Florianópolis, abrangem uma área de 419,90 Km<sup>2</sup>, com população de aproximadamente 18.000 habitantes e sua principal economia é agricultura. Clima mesotérmico, apresenta altitude de 28 m acima do nível do mar, verão úmido e temperatura média de 19,3°C. As chuvas na região concentram-se nos meses de Janeiro, Fevereiro, Março e Setembro (EPAGRI, 2007).

Os rios acima citados têm uma vital importância para região, pois banha as áreas agriculturáveis localizadas as suas margens, e beneficia os rizicultores de todo vale (HADILICH, 1997). Contribui para outras culturas, como a pecuária, pesca, turismo, e o abastecimento de água potável para os habitantes da região.

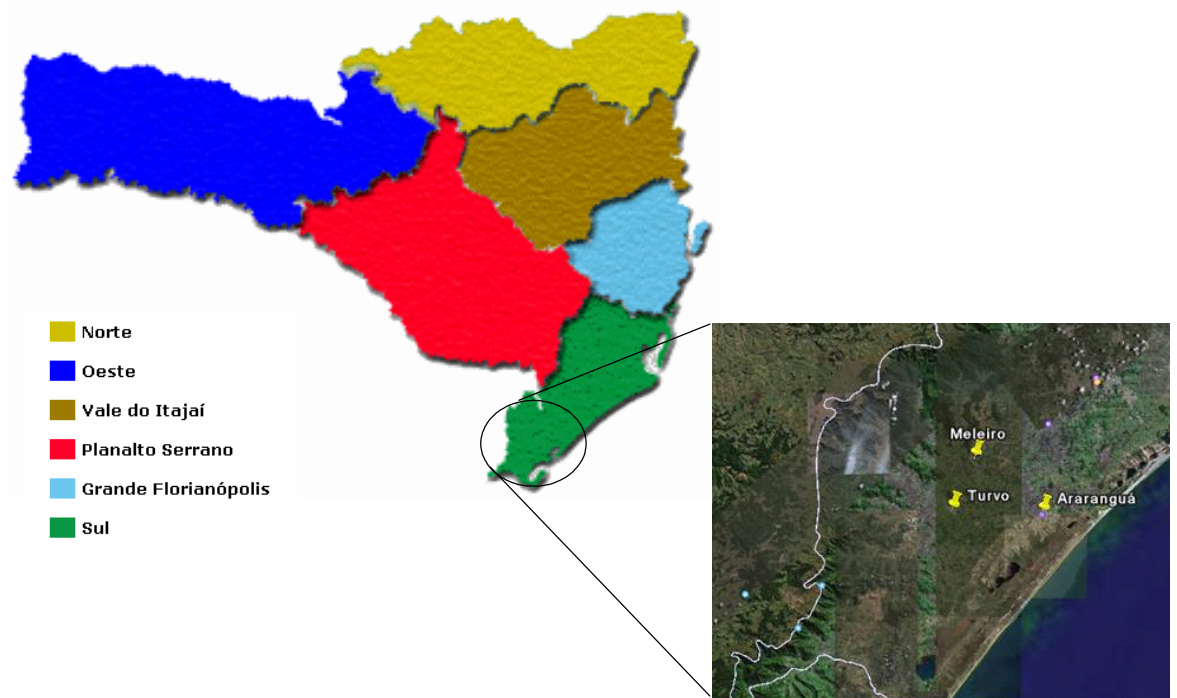
Segundo HADILICH (1997), parte dos pesticidas aplicados durante a safra, são absorvidos pelas argilas contidas no solo, quando ali depositados permanecem expostos às inúmeras reações químicas, físicas e biológicas. Desta forma, sabe-se que a aplicação destes produtos é perceptível pelo odor característico que se constata em cidades como Turvo e Meleiro. Geralmente, a população costuma

atribuir os elevados níveis de turbidez dos rios, principalmente na época do preparo das canchas de arroz, a contaminação por pesticidas utilizados na lavoura.

No Brasil são cultivados anualmente 1,3 milhões de hectares com arroz irrigado, das quais cerca de 800 mil toneladas anuais estão em Santa Catarina. Apesar da grande contribuição do estado de Santa Catarina na produção de arroz, pouco se fez até o momento em relação a estudos de comportamento e destino dos herbicidas no sistema, visando à manutenção da eficiência com menor risco de dano ambiental (ICEPA, 2005; PRIMEL et al., 2005).

Em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul, produtores de arroz irrigado adotam a prática da rizipiscicultura que poderia ser diretamente afetada pela utilização desses produtos. Durante as etapas iniciais de desenvolvimento da rizipiscicultura pode haver necessidade do uso de herbicidas para o controle de algumas espécies de plantas daninhas, especialmente aquáticas (PRIMEL et al., 2005).





**Figura 2:** Mapa de Santa Catarina (GOOGLE EARTH, 2007).

A)



B)



**Figura 3:** (A) curso do rio pela cidade de Turvo (B) Rio Amola Faca (Google Earth, 2007).



A)



B)



**Figura 04:** (A) Curso do rio próximo à cidade de Meleiro (B) Rio Jundiá (Google Earth, 2007).



A



B



**Figura 5:** (A) Curso do rio próximo à cidade de Meleiro (B) Rio Itoupava (Google Earth, 2007).



A)



B)



**Figura 06:** (A) Curso do rio passando pela cidade de Meleiro (B) Rio Manoel Alves (Google Earth, 2007).

## 2.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

A cromatografia iniciou-se no ano de 1903 com o botânico russo Michael Tswett, realizando uma separação de pigmentos de cloroplastos contidos em folhas verdes de plantas utilizando um tubo de vidro com carbonato de cálcio. A cromatografia é um método físico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fixa de grande área superficial chamada de fase estacionária e a outra de um fluído que percola através dela sendo por isso denominada fase móvel (LANÇAS, 1993).

Os métodos cromatográficos podem ser classificados quando ao mecanismo de separação, quanto à técnica empregada, em relação à fase utilizada e quanto ao tipo de superfície na qual a separação ocorre. Esta última é a mais popular, onde se a separação cromatográfica ocorre dentro de um tubo (vidro ou metal), a técnica é denominada cromatografia em coluna. No entanto, se a separação ocorre em uma superfície plana (placa de vidro ou metal impregnado com a fase estacionária, ou então uma folha de papel de filtro embebida com solvente apropriado) será denominada planar (LANÇAS, 1993). A cromatografia em coluna poderá ser classificada em 3 grandes grupos de acordo com a fase móvel utilizada: cromatografia líquida quando a fase móvel for um líquido, cromatografia gasosa quando a fase móvel for um gás, ou cromatografia com fluído supercrítico quando um gás ou líquido no estado supercrítico for utilizado como fase móvel.

A cromatografia líquida (LC) é um método físico-químico de separação, complementar a cromatografia gasosa, pois permite a análise de compostos termolábeis, não voláteis e altamente polares. Na LC a fase móvel proveniente de um reservatório de solvente é bombeada permanentemente através de uma coluna

cromatográfica. A análise se inicia pela introdução da amostra, em solução, por meio de uma válvula de injeção. A partir da injeção, esta solução é separada na coluna cromatográfica e os compostos separados são observados na forma de pico por detector apropriado (LEITE, 2002). Estão disponíveis na cromatografia líquida diversos detectores, entre eles os detectores, tais como ultravioleta, fluorescência, arranjo de diodos e massas. Na literatura são encontrados diversos estudos visando à detecção de pesticidas em água por HPLC (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2002; GONZÁLEZ-BARREIRO et al., 2000; ASPERGER et al., 2001; BOSSI et al., 2002; MUÑOZ DE LA PEÑA et al., 2003; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2000)

Segundo LANÇAS (1993) a cromatografia gasosa (GC) é um procedimento físico utilizado para separar uma amostra em seus componentes individuais. A base para esta separação é a distribuição da amostra entre duas fases, uma fase estacionária e uma fase gasosa móvel. De acordo com a natureza da fase estacionária, ela é dividida em cromatografia gás-líquido onde a fase estacionária é uma película delgada líquida, a qual recobre um sólido inerte e a cromatografia gás-sólido onde a fase estacionária é um sólido de grande área superficial, como carvão vegetal, sílica-gel ou peneira molecular.

As unidades fundamentais de um sistema cromatográfico a gás são: gás de arraste, injetor, coluna (empacotada e capilar), forno, detector e registrador. O gás de arraste tem a função de levar as moléculas da amostra a ser separada do ponto de injeção até o detector, passando pela coluna onde irá ocorrer a separação. O gás de arraste é usualmente escolhido a partir do detector empregado. Quanto ao injetor a maioria das amostras líquidas requer que ele esteja 20 a 30 °C acima da temperatura de ebulição do componente mais volátil. Para a coluna cromatográfica, entre os diversos parâmetros a serem considerados quando da escolha da coluna,

deve-se destacar a fase estacionária (o suporte sólido e a fase líquida) e o tubo onde será acondicionado (material comprimento e diâmetro). São de suma importância em GC o controle da temperatura do injetor, coluna e detector.

O detector é o principal responsável pela quantidade mínima da substância a ser detectada. Estão disponíveis atualmente na GC diversos tipos de detectores: por condutividade térmica, por ionização em chama, por captura de elétrons, nitrogênio-fósforo, fotométrico de chama, condutividade eletrolítica, microcoulombimérico, fotoionização e massas.

Os detectores universais são capazes de quantificar uma enorme gama de componentes sem a necessidade de que os analitos possuam determinadas características únicas e restritivas para sua detecção. Entre esses pode-se citar o detector por ionização em chama (FID) e o detector por condutividade térmica (TCD). O detector FID é universal para compostos orgânicos, apresentando alta sensibilidade, boa estabilidade e fácil operação, porém é suscetível a interferência devido a sua baixa seletividade, sendo por esta razão pouco usada em análise de pesticidas (LEITE, 2002; HERNANDO et al., 2002). O detector TCD apresenta resposta a todos os tipos de compostos (orgânico ou aquoso, polar ou apolar, etc.) exceto ao gás de arraste, é simples, barato, apresenta razoável linearidade e boa estabilidade. Por não ser destrutivo pode ser usado com vantagens em escala preparativa. No entanto, é extremamente sensível a mudanças no fluxo de gás de arraste e requer calibração individual para determinações acuradas.

Entre os detectores mais seletivos, os quais podem, mas não necessariamente, aumentar o limite de detecção devido a este estar relacionado especificamente a uma propriedade físico-química, tem destaque o detector por captura de elétrons (ECD). O detector ECD tem seu fundamento baseado na



captura de elétrons pela amostra e apresenta as vantagens de ser sensível e não destrutivo. Pouco sensível à presença de hidrocarbonetos, álcoois, cetonas e várias classes de compostos orgânicos, sendo, portanto muito útil na determinação de certos compostos presentes em nível de traços. Tem sido usado para detecção de pesticidas organoclorados (GONÇALVES et al., 2002; LI et al., 2003) organofosforados (GONÇALVES et al., 2002; RISSATO et al., 2005), fungicidas (LAMBROPOULOU et al., 2000), herbicidas (GONÇALVES et al., 2002; AGUILAR et al. 1997; ZHAO et al., 2006), e piretróides (GONÇALVES et al., 2002; RISSATO et al., 2005; CASAS et al., 2006). No entanto, o ECD perde seletividade quando são injetados extratos de matrizes complexas, pois muitos compostos orgânicos podem interferir na resposta do detector (BARCELÓ et al., 1997).

Existem também detectores específicos os quais detectam substâncias que possuam determinado elemento ou grupo funcional em suas estruturas. Como exemplo o detector NPD, o qual é responsável por detectar analitos que possuam nitrogênio ou fósforo em sua estrutura. O detector NPD apresenta alta seletividade e sensibilidade, no entanto é destrutivo e de estabilidade regular. É utilizado para detecção de pesticidas organofosforados, carbamatos, triazinas, dinitroanilinas, dentre outros.

O espectrômetro de massas tem se destacado por fornecer informações sobre a estrutura química do composto (quando operado no modo scan) que está sendo eluído da coluna cromatográfica. Alternativamente, pode auxiliar a garantir a identificação do analito estudado não apenas pelo tempo de retenção, mas também pelo monitoramento de íons específicos (quando operado no modo sistema de monitoramento de íons), característicos do analito em estudo. A espectrometria de massa em série torna a técnica mais sensível e seletiva (LANÇAS, 1993). Uma

grande parte de trabalhos usa o detector de massas para detecção de pesticidas (LAMBROPOULOU et al., 2002; LÓPEZ-BLANCO et al., 2003; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2003; SANCHEZ-PRADO et al., 2004) sendo que se não for usado como detector único, mas para confirmação dos analitos.

A cromatografia gasosa de alta resolução a qual utiliza colunas capilares, contendo diversas fases estacionárias não polares ou semi-polares, promove uma excelente separação e, aliada aos detectores seletivos, tem sido a técnica mais referida na literatura para análise de pesticidas voláteis e termoestáveis.

## **2.6 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA**

A análise cromatográfica da amostra que contém os analitos alvo do estudo, em geral, precede de etapas de preparo de amostra. O preparo da amostra é uma das etapas mais críticas da análise química e consiste na extração, que visa à remoção dos analitos da matriz, e no isolamento dos analitos de interesse que focaliza na eliminação dos interferentes (LANÇAS, 2004).

O principal objetivo dos métodos de preparação de amostras é transferir os analitos com interesse da matriz original, numa forma mais adequada para introdução na instrumentação cromatográfica, podendo a análise ser direta quando em presença de teores significativos ou com recurso de estratégias para o enriquecimento de traços vestigiais, no sentido de ganho de sensibilidade (ALMEIDA et al., 2007).

A classificação dos métodos de preparo de amostra geralmente ocorre de acordo com a fase extratora: gasosa, líquida ou sólida. Os principais métodos são headspace, extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME),

extração líquido-líquido (LLE), extração com fluido supercrítico, extração acelerada com solvente, extração com água sub-crítica, extração com solventes assistida por microondas), extração com Soxhlet, dispersão da matriz em fase sólida e extração por sorção em barra de agitação.

Para análise de compostos orgânicos voláteis, a técnica de headspace estático e dinâmico (purge & trap) são as metodologias correntemente utilizadas para análise de matrizes líquidas e sólidas (ALMEIDA, 2007).

Até recentemente a técnica mais usada no preparo de amostra era a ELL que se baseiam na solubilidade relativa dos analitos presentes na amostra em dois solventes idealmente imiscíveis. Esta tem sido particularmente usada no enriquecimento de compostos orgânicos semi-voláteis (LANÇAS, 2004; ALMEIDA et al. 2007). É uma técnica, em geral, tediosa que requer grandes quantidades de solventes, de difícil automação e de pequena reprodutibilidade e repetitividade em decorrência das várias etapas de manipulação da amostra (LANÇAS, 2004). Além desta, várias outras técnicas têm sido empregadas com intuito semelhante, incluindo destilação, filtração, centrifugação, cromatografia líquida preparativa em coluna aberta e outras (LANÇAS, 1993).

A extração em fase sólida é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão. Esta se comporta como uma cromatografia líquida empregando-se uma pequena coluna aberta, denominada cartucho de extração que contém a fase sólida. Dentre os modos de operação na SPE destaca-se a concentração dos analitos (enriquecimento), isolamento do analito, isolamento da matriz e estocagem da amostra. Dependendo do modo de operação, podem ocorrer pequenas variações nas etapas envolvidas, mas no geral inicia pelo condicionamento do cartucho,

adição da amostra, remoção dos interferentes e finaliza com a eluição dos analitos. Os principais mecanismos de separação atualmente em uso em SPE são adsorção, partição, troca iônica e exclusão por tamanho (LANÇAS, 2004). Esta técnica é bastante utilizada na preparação de amostras para determinação de pesticidas em água (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2002; BOSSI et al., 2002; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2000; AGUILAR et al., 1997; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2003).

Os métodos exaustivos como ELL ou SPE têm como principal objetivo obter uma transferência quantitativa dos analitos alvos junto à fase extratora na ordem para ter 100% de recuperação e a consequência disto é que a seletividade é frequentemente perdida porque muitos componentes da matriz são co-extraídos (PAWLISZYN, 1995).

Mesmo sendo metodologias abrangentes e eficazes, as metodologias de preparação de amostras envolvendo solventes orgânicos, já não se coadunam com as atuais exigências de redução de tempo despendido e automatização, necessárias à maior eficácia do trabalho de rotina dos laboratórios analíticos. Assim a miniaturização tem vindo assumir uma tendência dominante em química analítica, sendo cada vez mais implementada em diversos processos de enriquecimento, com o objetivo de reduzir o volume da amostra. Também atualmente preocupa-se com o consumo excessivo de solventes orgânicos tóxicos, tendo em vista o impacto ambiental que isso acarreta. Assim, têm surgido novos conceitos aliados a novas metodologias que conseguem conjugar a miniaturização analítica com redução ou mesmo eliminação dos solventes orgânicos para enriquecimento de compostos alvos em diversos tipos de matrizes. Destaca-se nesse contexto a SPME e a SABLE, que além de reduzirem a manipulação analítica, proporcionam significativa

sensibilidade na recuperação de analitos, elevada repetitividade, rapidez, baixo custo e facilidade de automatização (ALMEIDA, 2007).

### **2.6.1 Microextração em fase sólida**

A microextração em fase sólida teve seu primeiro conceito publicado em 1989 por BELARDI e PAWLISZYN, mas o grande desenvolvimento da técnica ocorreu na década de 90 (BELTRAN, 2000). A primeira microseringa para uso comercial em SPME foi comercializada em 1993 pela Supelco, juntamente com fibras de diferentes revestimentos para extração, sendo inicialmente de polidimetilsiloxano (PDMS) e poliacrilato (PA). Com passar dos anos, as fibras vêm se multiplicando para diferentes revestimentos como: Carbowax-divinilbenzeno; PDMS-divenilbenzeno; Carboxen-PDMS, entre outras (OLIVARES, 2006).

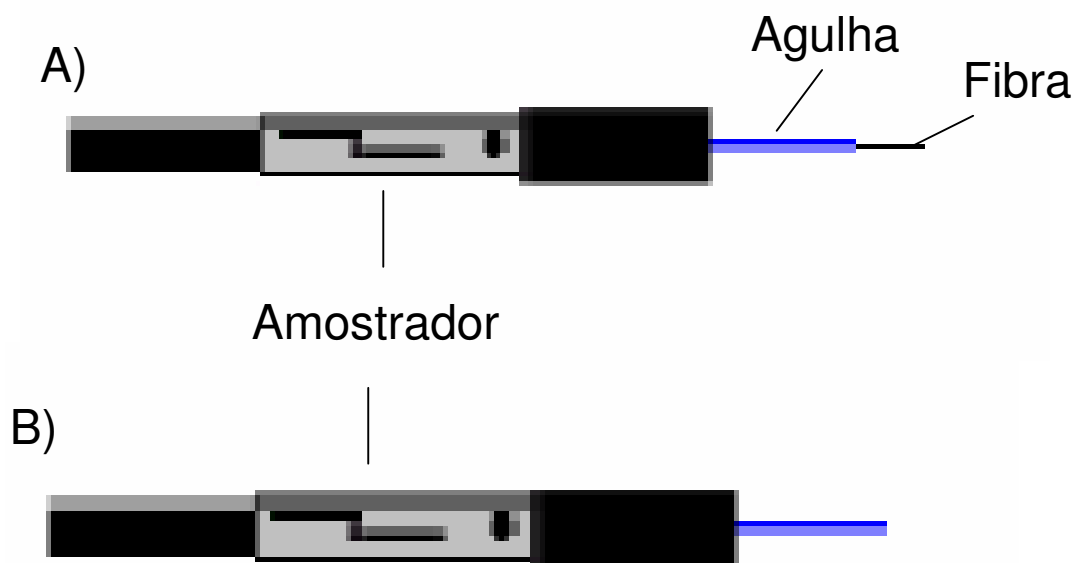
A SPME consiste basicamente em dois estágios de separação: absorção (retenção do analito na fase estacionária), e desorção. Para o desenvolvimento de procedimentos para análise de pesticidas utilizando esta técnica, é necessário à otimização de diferentes tipos de variáveis no estágio de absorção como: tipo de fibra; tempo de extração; força iônica; pH; temperatura; efeito da matriz; volume da amostra; agitação; tempo de desorção (BELTRAN, 2000; CASAS et al., 2006; OLIVARES., 2006). Sua forma original baseia-se na sorção dos analitos por uma fibra de sílica modificada quimicamente, com posterior desorção térmica dos analitos em um cromatografo a gás (HERNANDO, 2002; LANÇAS, 2004). É uma técnica relativamente simples do ponto de vista experimental, e apresenta diversas vantagens sobre as técnicas tradicionais, como exemplo o procedimento analítico é

mais simples e mais rápido que a ELL, e SPE, em geral extratos mais limpos são obtidos, além de não usar solventes para eluição (OLIVARES, 2006).

O dispositivo básico da SPME consiste de um bastão de fibra ótica, de sílica fundida de 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com 1 cm de uma extremidade recoberta com um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente. Na **Figura 7** pode ser observado um dispositivo da fibra de SPME. Além do dispositivo de fibra é necessário um amostrador (espécie de seringa) que permite o manuseio das fibras para a extração. Neste amostrador (**Figura 8**) a fibra é presa a um êmbolo. Na extremidade oposta ao êmbolo, o tubo hipodérmico fica exposto, pois além de proteger a fibra ele é a agulha com que é perfurado o septo (VALENTE et al., 2000).

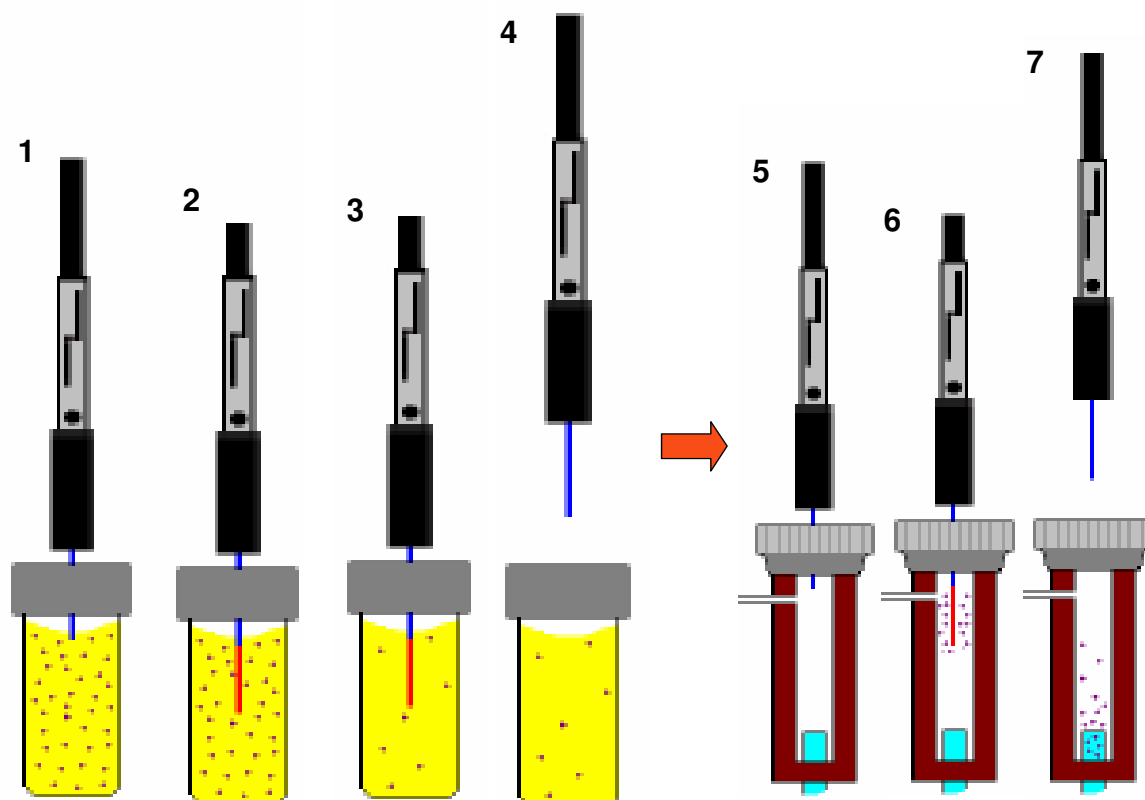


**Figura 7:** Dispositivo da fibra de SPME com a fibra retraída.



**Figura 8:** Amostrador de SPME: A) amostrador com a fibra exposta; B) amostrador com a fibra retraída (AUGUSTO, 2000).

O processo de SPME pode ser resumido em duas fases: a primeira os analitos alvos são extraídos de uma matriz quando a fibra é exposta à amostra por um determinado tempo. Segundo, a fibra é removida da amostra e os analitos retidos são dessorvidos em um instrumento analítico para serem separados e quantificados (HERNANDO, 2002). As etapas para o procedimento de extração e desorção podem ser observadas mais detalhadamente na **Figura 9**. Com a fibra retraída na agulha, o septo do frasco de amostra é perfurado e a fibra é exposta à amostra. Terminando o tempo de extração a fibra é novamente retraída, a agulha é retirada do septo e levada para inserção no GC. Com a fibra retraída o septo do injetor é perfurado, a fibra é exposta para dessorção térmica e terminado esse processo é retraída e retirada do injetor (VALENTE 2000).



**Figura 9:** Extração no modo direto e dessorção por SPME. (1) perfuração do septo com a agulha; (2) exposição da fibra de SPME diretamente na amostra líquida; (3) após um determinado tempo de extração; (4) recolhe-se a fibra e remove-se do frasco de amostra; (5) agulha introduzida no injetor aquecido do GC; (6) fibra exposta ao injetor (analitos dessorvidos termicamente) e (7) fibra recolhida e agulha retirada do injetor (analitos arrastados para a coluna) (AUGUSTO, 2007).



Na extração por SPME as moléculas do analito têm de se deslocar da matriz e penetrar no recobrimento e, para isto, resistências a transferências de massa devem ser vencidas, até que se estabeleça um equilíbrio de partição (ou de adsorção para o caso de recobrimentos sólidos) do analito, entre a fibra e meio que a envolve. Portanto, a teoria de SPME baseia-se na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas (VALENTE et al., 2000). Na microextração em fase sólida não ocorre extração exaustiva, mas sim, equilíbrio entre a fase aquosa e a fase orgânica estacionária (LANÇAS, 2004).

A escolha do revestimento da fibra constitui um dos aspectos críticos na otimização da SPME e permitem obter uma boa seletividade para os analitos alvos. Diversos tipos de materiais têm sido estudados e a literatura apresenta uma lista de fibras comercialmente disponíveis e relaciona estas com o tipo de composto em que pode ser utilizada, porém esta deve ser otimizada experimentalmente (**Tabela 2**). A natureza química dos analitos alvos determina o tipo de recobrimento a ser usado. A seleção do recobrimento é baseada primariamente nas características de polaridade e volatilidade dos analitos (PAWLISZYN, 1999).

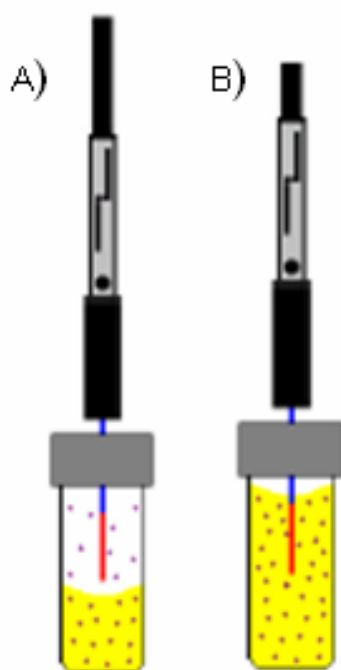
A espessura do filme da fase sólida determina a capacidade da fibra (quantidade de analito que pode ser extraído) e o tempo de extração. Filmes de maior espessura apresentam maior capacidade, mais requerem maior tempo de extração. Na prática, as principais fases empregadas em SPME são a polidimetilsiloxano (PDMS) e a poliacrilato (PA), com diferentes espessuras de filmes, dependentes principalmente da polaridade do analito a ser extraído (LANÇAS, 2004).

**Tabela 2.** Tipos de fibra comercializada para o uso em SPME

<b>Fase estacionária</b>	<b>Espessura do filme (μM)</b>	<b>ΔT<sup>a</sup> (°C)</b>	<b>Polaridade</b>	<b>Uso recomendado</b>
Polidimetilsiloxano (PDMS)				
	100	200-270	Apolar	GC/LC
	30	200-270	Apolar	GC/LC
	7	220-320	Apolar	GC/LC
Polidimetilsiloxano -divinilbenzeno (PDMS/DVB)				
	65	200-270	Bipolar	GC
	60	200-270	Bipolar	LC
Poliacrilato (PA)				
	85	220-310	Polar	GC/LC
Carbowax-divinilbenzeno (CW/DVB)				
	65	200-260	Polar	GC/LC
Carboxen-PDMS (CAR/PDMS)				
	75	240-300	Bipolar	GC
	85	240-300	Bipolar	GC
Carbowax –templated resin (CW-TPR)				
	50	-	Polar	LC
Divinilbenzeno –carboxen- PDMS (DVB-CAR-PDMS)				
	30	270	Ampla faixa de polaridade (C <sub>3</sub> a C <sub>20</sub> )	GC
	50	270		GC

Fonte: Supelco, 2007.

Modo de extração - pode ser realizado principalmente no modo direto e no modo headspace, também chamado de espaço confinante (**Figura 10**). No modo de extração direto, a extração ocorre mergulhando a fibra diretamente na solução da amostra, onde ocorre o transporte dos analitos da amostra para a fase extratora. Já a técnica de headspace a fibra não entra em contato com a amostra, ela fica exposta somente ao headspace, sendo que os analitos têm de ser transportados através da barreira de ar antes de atingirem o recobrimento da fibra (QUEIROZ, 2001; LANÇAS, 2004; PAWLISZYN, 1999).



**Figura 10:** Modo de extração na SPME: A) modo headspace; B) modo direto.

Temperatura de extração - temperatura influencia na solubilidade dos analitos e assim no processo de partição entre as duas fases. Isso ocorre particularmente em soluções aquosas, pois a constante dielétrica da água diminui rapidamente com a temperatura, alterando o equilíbrio entre as fases. Em geral, aumento na temperatura da extração provoca aumento na velocidade extração e diminuição na constante de distribuição, reduzindo o tempo necessário para atingir o equilíbrio de extração (LANÇAS, 2004). No entanto, elevadas temperaturas podem diminuir o coeficiente de distribuição entre a fase estacionária e o analito (OLIVARES, 2006).

Tempo de extração - SPME é baseada no equilíbrio do processo de distribuição, a máxima quantidade de analito deverá ser extraída quando o tempo de equilíbrio for estabelecido (HERNANDO, 2002). Para compostos cujos valores para o coeficiente de partição são baixos o tempo necessário é longo, e então um tempo inferior ao ideal pode ser escolhido. A otimização do tempo de contato entre a fibra e a amostra é fundamental para obter o máximo de sensibilidade (LANÇAS, 2004).

Velocidade de agitação - agitação da amostra diminui o tempo necessário para atingir o equilíbrio, porque ele aumenta a difusão dos analitos em direção as fibras. Também na extração por headspace, a agitação facilita a transferência de massa entre a fase aquosa e o headspace (HERNANDO, 2002). A agitação deve ser mantida constante na solução da amostra, para que se reproduza o experimento (LANÇAS, 2004).

Influência do pH - esse parâmetro apresenta forte influência na sensibilidade da extração. Em meio aquoso, o pH afeta o equilíbrio de dissociação. Uma diminuição

do pH provoca aumento na concentração de espécies neutras de compostos ácidos, aumentando a quantidade extraída. No caso de compostos ácidos, uma melhora na extração é obtida ajustando-se o valor do pH para duas unidades abaixo do valor do pK ; para compostos básicos, o pH deve ser ajustado duas unidades acima do valor de pK. Em geral para compostos de caráter ácido ou básico, é imprescindível um ajuste de pH da amostra para que se obtenha melhor desempenho na extração. No entanto deve-se tomar cuidado no caso da extração direta, pois valores extremos de pH, tanto altos como baixos danificam a fibra (LANÇAS, 2004).

Concentração salina - adição de um sal à solução da amostra geralmente melhora a extração dos analitos, principalmente para os analitos mais polares. Concentrações de sal entre 1 a 30% têm sido empregadas na análise de amostras aquosas. O aumento da força iônica provoca redução na solubilidade do analito na matriz, facilitando a sua extração pela fibra (LANÇAS, 2004). No entanto este efeito não é geral e depende da polaridade do analito, da concentração do sal e da matriz da amostra (HERNANDO, 2002). Em alguns casos que engloba analitos altamente polares ou passíveis de sofrer dissociação iônica em meio aquoso, este aumento da força iônica pode provocar efeito contrário e provocar uma diminuição da eficiência da extração.

Volume da amostra - o volume da amostra é um parâmetro importante, uma vez que a massa dos compostos extraídos pela fibra é função do volume e da concentração inicial na amostra (ALMEIDA et al., 2007). O volume da amostra está diretamente relacionado à sensibilidade do método. O volume da amostra é

usualmente muito maior do que o volume da fibra, e a quantidade extraída são somente proporcional ao coeficiente de partição, concentração da amostra e volume da fibra (HERNANDO, 2002; PAWLISZYN, 1999).

Tempo de dessorção - a associação adequada do tempo e temperatura de dessorção da fibra do injetor (operado no modo *splitless*) e a programação de temperatura da coluna é de vital importância para análise em SPME, uma vez que esta associação pode encaminhar os analitos através de uma condição adequada ao detector para obtenção de um melhor sinal (OLIVARES, 2006). Uma desorção eficiente e rápida transferência dos analitos para o injetor e coluna requerem alta velocidade de fluxo linear do gás carreador ao redor do recobrimento (PAWLISZYN, 1999).

A técnica de SPME tem sido aplicada em diversos campos de pesquisa, com aplicações físico-químicas, ambientais, aromas e flavorizantes em alimentos, além de aplicações clinicam farmacêuticas e forenses (PAWLISZYNS, 1999). Para a análise de pesticidas, observa-se um grande emprego desta técnica para extração de diferentes tipos de pesticidas em vários tipos de matrizes (LAMBROPOULOU et al., 2002; GONZÁLEZ-BARREIRO et al., 2000; GONÇALVES et al., 2002; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2003; BOUAID et al. 2001; SANCHEZ-PRADO et al., 2004; DUGAY et al., 1998; KOMATSU e al., 2004). Na **Tabela 3** pode ser observado alguns trabalhos que utilizaram a SPME para a determinação de herbicidas em água.

**Tabela 3:** Revisão Bibliográfica sobre análise de herbicida em água por SPME.

Grupo de Herbicidas	Fibra/ modo extração	Deteção	Matriz	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ano
Triazina	PA/ direto	GC-NPD	Água de profundidade	0,01-0,09	1995
Triazina	PDMS PA/ direto	GC-MS	Água de profundidade e superfície	0,004-0,023 (PDMS) 0,006 – 0,019 (PA)	1996
Triazina	PA/ direto	GC-FID GC-ECD	Água de esgoto e superfície	-	1996
Triazina	PA/ direto	GC-FID GC-NPD GC-MS	Água ultrapura	1-14 (FID) 0,04-6 (NPD) 0,0003-0,03 (MS)	1995
Triazina	PA/ direto	GC-MS	Água potável e superfície	0,02-0,2 (SCAN); 0,01-0,02 (SMI)	1998
Triazina	PA/ direto	GC-MS	Água residual	0,75 -0,25 (SCAN); 0,007-0,01 (SIM)	1995
Triazina	PDMS/direto	GC-NPD	Água ultrapura	-	1995
Triazina	PDMS/direto	GC-NPD GC-MS	Água de profundidade e superfície	0,04-0,40 ( NPD) 0,01-0,04 (MS)	1996
Triazina	CW-DVB/ direto	GC- NPD	Água potável e de rio	0,03-0,1	1998
Triazina	CW-DVB/ direto	GC-MS	Água de profundidade e superfície	0,02-0,06	2000
Triazina	PDMS- DVB/ direto	GC-ECD	Água potável e de profundidade	0,001- 0,01	2002

Triazina	PDMS/ direto	GC-FID GC-MS	Água de rio	0,005-0,030 (FID) 0,01-0,04 (MS)	2002
Triazina	PA/ direto	GC-MS	Água ultrapura	0,04 -0,10	2004
Triazina	PA/direto	CG-MS	Água de profundidade e superfície	0,02	2003
Triazina	PDMS/ direto	GC-MS	Água de drenagem	0,25	2007
Dinitroanilinas	PA/ direto	GC-MS	Água residual	0,11-2,6 (SCAN) 0,004-0,042 (SIM)	1995
Dinitroanilinas	PA/ direto	GC-NPD	Água de profundidade	0,005-0,06	1995
Dinitroanilinas	PA/ direto PDMS	GC-MS	Água de profundidade e de superfície	0,001 (PDMS) 0,001 (PA)	1996
Dinitroanilinas	PDMS/ headspace	GC-ECD	Água de superfície	0,1	1998
Dinitroanilinas	PA/ direto	GC-MS	Água ultrapura	0,006	2004
Dinitroanilinas	PA/direto	GC-MS	Água de profundidade e superfície	0,01	2003
Várias classes	PA/ direto	GC-MS	Água residual	0,4-1,9 (SCAN); 0,013-0,055 (SIM)	1995
Várias classes	PA/ direto PDMS	GC-MS	Água de profundidade e superfície	0,001-0,013 (PDMS); 0,001- 0,016 (PA)	1996
Várias classes	PA/ direto	GC-FID	água	0,2-6,0 (FID)	1995



		GC-NPD	ultrapura	0,01-0,8 (DNP)	
		GC-MS		0,00001-0,015 (MS)	
Várias classes	CW-DVB/ direto	GC-NPD	Água potável e água de rio	0,1-0,4	1998
Várias classes	PDMS/direto	GC-NPD GC-MS	Água de profundidade e superfície	0,13-27,52 (NPD); 0,01-2,5 (MS)	1996
Cloro- acetanilidas	PDMS- DVB/direto	HPLC - DAD	Água	0,27	2000
Cloro- acetanilidas	PDMS/ direto	GC-TCD GC-MS	Água de rio	0,01-0,03 (TCD) 0,015-0,025 (MS)	2002
Cloro- acetanilidas	PA/direto	GC-MS	Água de profundidade e superfície	0,03	2003
Cloro- acetanilidas	PDMS/ direto	GC-MS	Água de drenagem	0,25	2007

**Fonte:** (LAMBROPOULOU et al., 2002; ROCHA et al., 2007; GONZÁLEZ-BARREIRO et al., 2000; GONÇALVES et al., 2002; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2003; KOMATSU et al., 2004; BELTRAN et al., 2000).

## 2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Assim para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominado validação (RIBANI, 2004; LANÇAS, 2004; LEITE, 2002).

Validação é definida como ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. Visa diminuir ou controlar os fatores que levam a imprecisão ou inexatidão de um dado gerado. Entre esses fatores podem ser citados: variabilidade de amostra, eventual contaminação, reagentes inadequados, pipetagem errada, variações de temperatura, variações e descuidos na manutenção dos equipamentos, além de calibração ineficiente, analista despreparado e perdas durante a análise (LANÇAS, 2004).

A validação metodológica consiste no desenvolvimento e posterior controle, de determinada metodologia analítica implantada em um laboratório, parte fundamental de um programa de garantia de qualidade. E todo laboratório envolvido com controle de qualidade precisa garantir que suas análises sejam corretas, exatas e precisas. Para isso devem-se efetuar medidas de qualidade como: teste do equipamento (instrumento e computador), validação do método no equipamento testado; teste de adequação do sistema, envolvendo o equipamento e o método validado (LANÇAS, 2004).

A validação total de um método pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico. Em geral, a validação envolve a execução e interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do método. A validação do método

não deve ser feita em uma única etapa, só para atender as agências de regulamentação, mas também para assegurar a robustez. Os métodos devem ser reproduzíveis quando usados por outros analistas, em equipamentos equivalentes em outros dias e em locais diferentes. Os dados que são gerados são dignos de confiança somente se os métodos usados para gerar os dados são também confiáveis (QUEIROZ, 2001).

Os parâmetros a serem validados variam de uma área para outra. No Brasil, os requisitos para a validação de metodologia analítica para a área de saúde e agricultura diferem em vários aspectos (LANÇAS, 2004). No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, suas similaridades e diferenças podem ser observadas (RIBANI et al., 2004) **Tabela 4.**

Diversos parâmetros devem ser incluídos em um processo de validação de um método analítico, entre eles: exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), sensibilidade, especificidade, recuperação e robustez.

**Tabela 04:** Parâmetros de validação do INMETRO e ANVISA

<b>INMETRO*</b>	<b>ANVISA**</b>
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho	Intervalo da curva de calibração
Linearidade	Linearidade
	Curva de calibração
Limite de detecção	Limite de detecção
Limite de Quantificação	Limite de Quantificação
Sensibilidade (inclinação da curva)	-
Exatidão e tendência	Exatidão
Precisão	Precisão
Repetitividade	Repetibilidade (precisão intra-corrida)
Precisão intermediária	Precisão intermediária (precisão inter-corrida)
Reprodutibilidade	Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)
Robustez	Robustez
Incerteza da medição	-

\* Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.

\*\* Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado. Esta é determinada por intermédio de curvas de calibração, seguidos de um tratamento estatístico. Para obtenção de uma curva de calibração, deve-se construir um gráfico relacionado à resposta do equipamento em função de várias concentrações do analito em estudo. A variável independente (eixo X) relaciona-se às várias concentrações preparadas do padrão analítico da substância de interesse, e a dependente (eixo Y), ao sinal de analítico obtido para cada concentração do padrão.

O número mínimo de pontos geralmente aceito nos gráficos de calibração varia entre 5 e 6 pontos. Essas concentrações devem ser escolhidas de forma a cobrir uma faixa desde 50 até 150% do valor que se espera encontrar na amostra em estudo. A curva de calibração deve incluir no mínimo a equação da função equação 1, a análise da regressão e os dados de correlação e determinação. A equação da reta, neste caso, terá a forma:

$$Y = ax + b \quad (1)$$

Onde: y = variável dependente; X = variável independente; a = coeficiente angular e b = coeficiente linear. O coeficiente angular (a) expressa a inclinação do gráfico em relação aos eixos, enquanto o coeficiente linear expressa a interseção do gráfico com os eixos. A correlação é normalmente calculada por intermédio do coeficiente r de Pearson, ou pelo coeficiente de determinação ( $r^2$ ). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90. Esses dois parâmetros r e  $r^2$  servem também para definir a faixa dinâmica ou o intervalo dinâmico. A faixa dinâmica não deve ser confundida com a faixa de linearidade, na qual a resposta do sistema deve ser linear com a concentração. Portanto a faixa

dinâmica é mais ampla que a faixa de linearidade (LANÇAS, 2004; INMETRO, 2007; ANVISA, 2003).

Limite de detecção (LOD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato. Na prática o LOD pode ser determinado como a menor concentração do analito que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança. Geralmente para distinguir o sinal analítico do ruído, considera-se LOD a concentração ou massa do analito que gera um sinal três vezes maior do que o ruído do sistema, ou seja,  $LOD = 3N$ . Também se pode definir LOD como a concentração ou massa do analito que produz um sinal igual a  $3s$ , sendo “s” o desvio padrão do ruído medido empregando um branco em vez do sinal do equipamento apenas. Além dessas duas maneiras, o LOD pode ser calculado como sendo  $3,3 \times S$  (desvio padrão do branco da amostra) dividido pelo coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al. 2004; LANÇAS, 2004).

O limite de quantificação (LOQ) ou determinação é o menor valor determinado, em confiabilidade de precisão e exatidão aceitáveis, para aquela condição analítica (LEITE, 2002). Sendo frequentemente detectado como  $10 \times S$  (desvio padrão do branco da amostra) dividido pelo coeficiente angular da curva analítica.

A precisão mede o quão bem os resultados obtidos se assemelham entre si. Portanto a precisão mede a capacidade de repetir (em condições experimentais muito próximas) ou reproduzir (em condições experimentais menos próximas) um resultado analítico (LANÇAS, 2004; LEITE, 2002).

A repetitividade expressa a fidelidade obtida nas mesmas condições operacionais (mesmo analista, mesmo equipamento, etc.) aplicadas em um curto

intervalo de tempo. Este parâmetro deve ser aplicado no mínimo para o tempo de retenção do analito ( $t_r$ ) e a área ou altura do pico (LANÇAS, 2004).

A reprodutibilidade designa a fidelidade entre laboratórios, geralmente obtida em análise colaborativa. Sua principal função é confirmar se determinada metodologia pode ou não ser transferida de um laboratório para outro, gerando resultados aceitáveis dentro dos critérios estabelecidos (LANÇAS, 2004).

A sensibilidade analítica é igual à inclinação da reta de calibração dividida pela estimativa do desvio padrão. Esta grandeza depende de quanto o método é capaz de discriminar entre amostras de teores de analitos semelhantes. Depende da inclinação da curva analítica, onde se dois métodos têm igual precisão, o mais sensível é o que possui a curva de calibração com maior inclinação (LEITE, 2002).

A seletividade corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação. A espécie de interesse deve ter o sinal analítico isento de interferências que possam levar à confusão na identificação ou dar margem de não confiabilidade ao resultado quantitativo (LEITE, 2002; LANÇAS, 2004).

A exatidão traduz a concordância dos valores experimentais como o valor verdadeiro, ou seja, mede o quanto o valor obtido se assemelha ao valor tido como verdadeiro (valor assumido como real) (LEITE, 2002; LANÇAS, 2004)..

A recuperação é uma medida de eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente. Esta deve ser avaliada em várias concentrações, uma vez que pode variar bastante em concentrações muito baixas. Na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperações dentro da faixa de 70 a 120% são aceitas.

A recuperação pode ser obtida de forma absoluta ou relativa (equação 2). A recuperação absoluta é definida como a porcentagem da resposta de um padrão analítico puro que não foi submetida ao mesmo pré-tratamento da amostra. A recuperação relativa é determinada comparando-se a resposta obtida com a matriz àquela com um solvente puro (LANÇAS, 2004).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor adicionado}} \times 100 \quad (2)$$

A quantificação dos analitos em validação pode ser obtida através dos seguintes métodos: padronização externa, padronização interna, superposição da matriz e adição padrão (RIBANI et al., 2004). Os mais utilizados são a padronização externo e a interna. O método de padrão externo é mais simples, rápido e barato, porém muitas vezes sujeito a erros; o método do padrão interno é mais demorado, caro e menos sujeito a erros, desde que o padrão interno seja escolhido adequadamente (LANÇAS, 2004; LEITE, 2002).

A robustez é uma medida da capacidade de um método de não sofrer alterações em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método. Esta mede a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo fixar as tolerâncias dos fatores do método. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberado em seus parâmetros (LANÇAS, 2004; INMETRO, 2007).



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL:**

Desenvolver métodos analíticos para determinação de herbicidas em águas superficiais através da microextração em fase sólida, por cromatografia gasosa e detector de captura de elétrons.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Padronizar e validar um método cromatográfico para a determinação simultânea de multirresíduos dos herbicidas, alaclor, atrazina e propanil, e um método cromatográfico para determinação do herbicida pendimetalina em água superficiais.
- Aplicar as metodologias analíticas desenvolvidas para análise dos herbicidas, atrazina, alaclor, propanil e pendimetalina em água de rios localizados próximos as culturas de arroz irrigado, nos municípios de Turvo e Meleiro.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento e aplicação do método para determinação dos herbicidas alaclor, atrazina, propanil e pendimetalina foram: Metanol, grau HPLC (Merck, Alemanha); ácido sulfúrico, hidróxido de sódio e cloreto de sódio, grau p.a, obtido da Synth (Brasil); acetonitrila grau HPLC, (Merck, Alemanha); água ultra-pura (18.2 MΩcm) obtida de um sistema Milli-Q de purificação (Millipore® -Bedford, MA, USA).

#### 4.1.2 Padrões

Os padrões analíticos todos da Sigma-Aldrich: alaclor, atrazina, propanil e pendimetalina, com grau de pureza superior a 98,3%.

#### 4.1.3 Equipamentos

- Cromatógrafo gasoso modelo CP 3800 (Varian, USA).
- Cromatógrafo gasoso modelo Saturno 2100 (Varian, USA)

#### 4.1.4 Material para microextração em fase sólida (SPME)

- Suporte (*Holder*) manual SPME (Supelco, USA)
- Fibras para SPME poliacrilato (PA), 85 µm; polidimetilsiloxano (PDMS), 100µm; carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), 75 µm; carboxen/divinilbenzeno (CW/DVB) 65 µm. (Supelco USA);

- Frascos de vidro âmbar de 20 mL de capacidade;
- septo de teflon/silicone (Pierce, USA).

## 4.2 MÉTODO

### 4.2.1 Preparo das soluções padrão

Soluções estoques individuais de alaclor, atrazina, propanil e pendimetalina, assim como a mistura dos herbicidas, quando necessário foram preparadas dissolvendo a quantidade apropriada dos padrões em acetonitrila grau HPLC, obtidos da Merck (Alemanha) na concentração de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Soluções intermediárias e as de trabalho foram obtidas a partir da diluição da solução estoque por meio de diluições sucessivas. Estas soluções foram utilizadas na determinação da linearidade do método, nas fortificações das amostras e na obtenção das curvas analíticas.

### 4.2.2 Condições Cromatográficas – GC- ECD/ GC-MS

Para a padronização da metodologia, validação e para a quantificação dos herbicidas foram realizadas em um GC-ECD. A coluna capilar usada foi CP SIL 8 CB, 50 m x 530  $\mu\text{m}$ , di. 5,0  $\mu\text{m}$  (Varian, USA), As injeções foram realizadas manualmente no modo *splitless*, com injetor a 280 °C. Vazão do gás de arraste (nitrogênio, White Martins) de 1 mL min<sup>-1</sup>. Varias programação de temperatura foram avaliadas e a mais satisfatória para a separação dos herbicidas em estudo foram: T<sub>coluna</sub> = 60°C (4 min) aquecimento até 140°C a 30°C min<sup>-1</sup>, de 10°C min<sup>-1</sup> até 270°C (5 min), o aquecimento do injetor para 280°C a 50°C min<sup>-1</sup> ( 5 min) e detector de 300 °C.

Para a identificação e confirmação dos herbicidas foi utilizado um GC-MS (Varian,USA). Efetuado nas mesmas condições cromatográficas já citadas anteriormente para o injetor, e programação de temperatura. A coluna capilar usada foi VF-5ms, 30m x 250  $\mu\text{m}$ , di, 0,25  $\mu\text{m}$ . Vazão do gás de arraste (hélio), 1 mL min<sup>-1</sup>.

As condições para ionização de impacto de elétrons de 70 eV e a faixa de varredura no MS de 40-650 m/z, sendo o modo de aquisição de dados *full-scan*, pela comparação dos espectros de massa obtidos para os padrões aplicados no sistema e com os espectros disponíveis na biblioteca "NIST" do próprio equipamento.

#### **4.2.3 Otimização da metodologia**

##### **4.2.3.1 Otimização das condições de extração para os herbicidas**

A padronização dos herbicidas alaclor, atrazina e propanil foram realizadas de modo univariado, sendo avaliados: tipo de fibra, modo de extração, pH e agitação da amostra, concentração salina, temperatura e volume da amostra, e tempo de extração. Os níveis de cada variável estudada estão apresentados na **Tabela 5**.

**Tabela 5:** Variáveis e níveis estudados para otimização univariada da metodologia para os herbicidas alaclor, atrazina e propanil.

Variáveis	Fibras e Níveis Estudados
Tipo de fibra	PA; PDMS; CAR/PDMS e CW/DVB
Modo de extração	Direto e headspace
pH da amostra	3; 4; 5; 6; 7 e 8
Concentração salina (%)	4; 10 e 23,3
Agitação (g)	0; 500; 750 e 1000
Temperatura da amostra (°C)	25; 40; 70 e 80
Volume da amostra (mL)	5; 10; 15 e 45
Tempo de extração (min)	20; 40; 70; 100 e 130

#### 4.2.3.2 Otimização das condições de extração para o herbicida pendimetalina

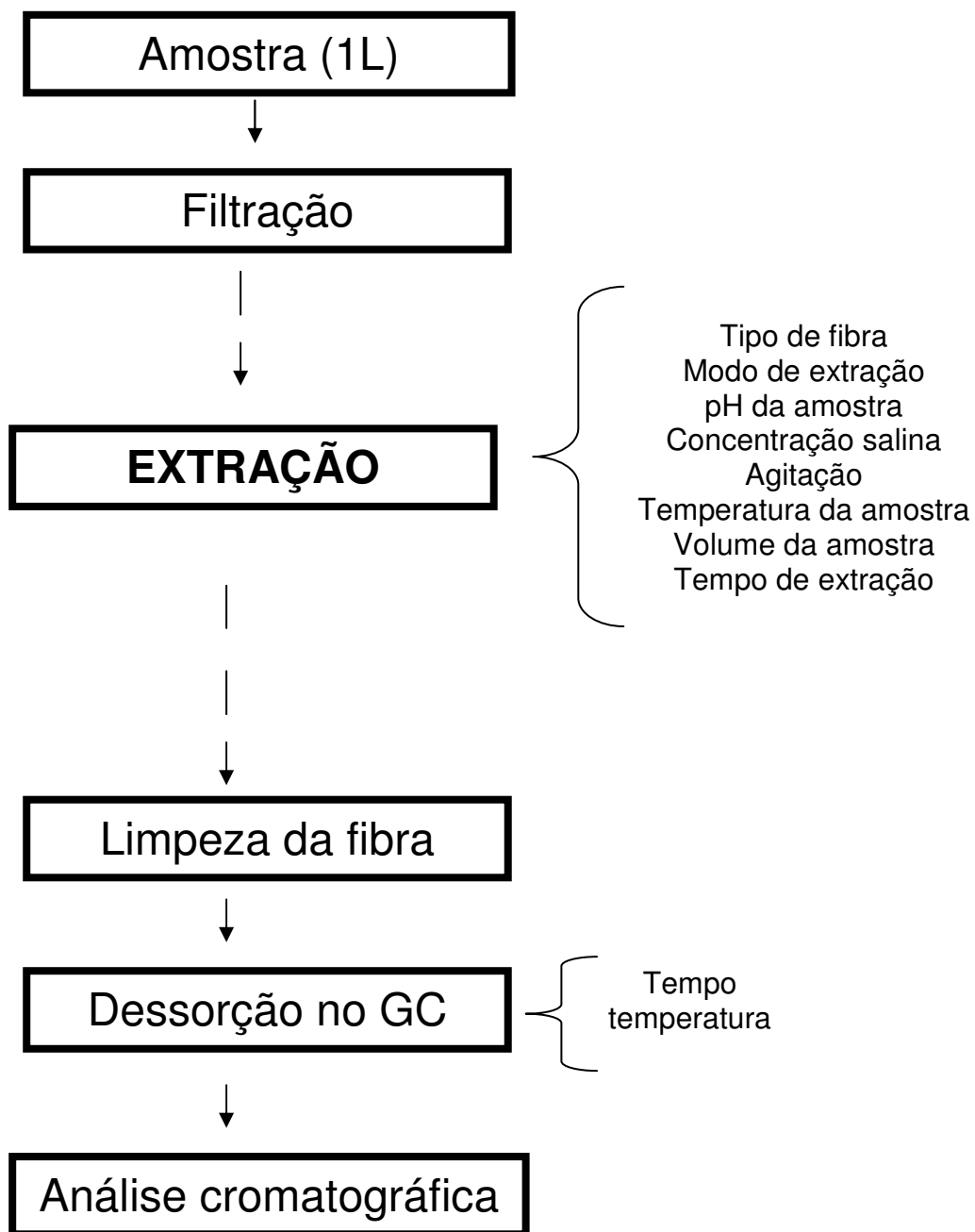
Para extração do herbicida pendimetalina os parâmetros analíticos (**Tabela 6**) foram padronizados no modo univariado, sendo avaliados: tipo de fibra, modo de extração, pH e agitação da amostra, concentração salina, temperatura e volume da amostra, e tempo de extração.

**Tabela 6:** Variáveis e níveis estudados para a otimização univariada da metodologia do herbicida pendimetalina.

<b>Variáveis</b>	<b>Fibra e Níveis Estudados</b>
Tipo de fibra	PA; PDMS; CAR/PDMS e CW/DVB
Modo de extração	Direto e headspace
pH da amostra	2; 4; 5; 6 e 8
Concentração salina (%)	0; 5; 10; 15 e 30 %
Agitação (g)	0; 500; 750 e 1000
Temperatura da amostra (°C)	22; 40; 70 e 80
Volume da amostra ( mL)	5; 10; 15 e 45
Tempo de extração (min)	20; 40; 70; 100 e 130

#### 4.2.4 Metodologia analítica

Um resumo da metodologia analítica está apresentado na **Figura 11**. A metodologia consiste no preparo da amostra através da técnica de SPME, com padronização das variáveis que influenciaram na extração e pré-concentração dos analitos e a determinação por cromatografia gasosa.



**Figura 11:** Fluxograma das etapas de extração e determinação herbicidas estudados.

#### 4.2.4.1 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS HERBICIDAS

**Herbicidas alaclor, atrazina e propanil:** A extração foi realizada com fibra de poliacrilato (PA) 85  $\mu\text{m}$ , modo de extração direto, o pH da amostra foi ajustado em 4 e a força iônica em 10% pela adição de NaCl. A amostra foi mantida sob agitação (750 g) temperatura de 70°C. O volume de amostra de 15 mL. O tempo de extração e de dessorção foram de 40 e 5 min, respectivamente.

**Herbicida pendimetalina:** A extração foi realizada com fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) 30  $\mu\text{m}$ , no modo de extração direto, o pH da amostra ajustado em 8. A amostra foi mantida sob agitação (750 g) e em temperatura de 70°C. O volume de amostra de 15 mL. O tempo de extração e de dessorção foram de 40 e 5 min, respectivamente.

#### 4.2.5 Validação dos métodos para extração dos herbicidas

##### 4.2.5.1 Herbicidas alaclor, atrazina, propanil.

Para a determinação dos parâmetros analíticos de mérito amostras de água destilada foram fortificadas para determinação da faixa linear. As concentrações utilizadas foram de 0,10; 0,12; 0,40; 0,50 e 0,60  $\mu\text{g L}^{-1}$  para alaclor, de 0,10; 0,27; 0,53; 3,0 e 4,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para atrazina e de 0,0015; 0,0050; 0,030; 0,10 e 0,30  $\mu\text{g L}^{-1}$  para propanil. Cada ponto foi realizado em triplicata.

O limite de detecção do método foi calculado como sendo  $3,3 \times \text{SD}$  do coeficiente linear dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração ( $\text{LOD} =$



3,3x SDa/b) e o limite de quantificação do método foi considerado como 10 x SD do coeficiente linear dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração ( $LOQ = 10 \times SD \text{ a/b}$ ).

Os ensaios de precisão ( $n=3$ ) e repetitividade ( $n=5$ ) do método foram realizados em amostras de água destilada em 2 níveis de fortificação, sendo 0,150 e 0,27  $\mu\text{g L}^{-1}$  para alaclor, 0,75 e 3,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para atrazina e 0,020 e 0,030  $\mu\text{g L}^{-1}$  para propanil.

A recuperação (%) foi calculada segundo a equação:  $R (\%) = \text{concentração encontrada} \times 100 \text{ dividido pela concentração fortificada}$ .

#### **4.2.5.1.2 Herbicida pendimetalina**

A linearidade para o herbicida pendimetalina foi avaliada nas concentrações de 0,050; 0,10; 0,25; 0,50 e 0,74  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em triplicata.

O limite de detecção do método foi calculado como sendo 3,3 x SD do branco da amostra dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração ( $LOD = 3,3 \times SDa/b$ ) e o limite de quantificação do método foi considerado como 10 x SD branco da amostra dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração ( $LOQ = 10 \times SD \text{ a/b}$ ).

A recuperação foi avaliada em duas matrizes, água de rio e água de torneira, nas concentrações de 0,18 e 0,37  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em triplicata. A repetitividade ( $n=5$ ) também foi realizada nas concentrações de 0,18 e 0,37  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### **4.2.6 Amostragem**

#### 4.2.6.1 Locais de amostragem

Para a determinação dos herbicidas alaclor, atrazina, propanil e pendimetalina as amostras de água de rio foram coletadas nos municípios de Turvo e Meleiro, região sul de Santa Catarina no período de Fevereiro a Maio de 2007. Foi coletado o total de 82 amostras, sendo 26 no rio Amola Faca, 31 no rio Manoel Alves, 14 amostras no rio Itoupava e 11 no rio Jundiá. Na **Tabela 7** pode ser observados o número de amostras e o período de realização da coleta.

**Tabela 7:** Número de amostras nos quatro rios estudados para a pendimetalina.

Coleta (data)	Número de amostras coletadas por rio				
	Amola Faca	Itoupava	Jundiá	Manoel Alves	Total p/coleta
1 (02/2007)	6	3	3	8	20
2 (03/2007)	7	4	3	6	20
3 (04/2007)	6	4	3	8	21
4 (05/2007)	7	3	3	8	21

#### 4.2.6.2 Procedimento de coleta

As amostras de água foram coletadas em frascos de vidro âmbar de 1 L, acondicionados em caixa de isopor (resfriadas com gelo) e transportadas diretamente para o Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina-LACEN. No laboratório as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose (0,45 µm) e mantidas sob refrigeração (4 a 5°C) até o momento da análise.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 DETERMINAÇÃO DE HERBICIDAS USADOS NO CULTIVO DE ARROZ IRRIGADO NA REGIÃO SUL DO ESTADO DE SANTA CATARINA ATRAVÉS DA SPME-GC-ECD**

#### **5.1.1 Otimização do procedimento de SPME**

##### **5.1.1.1 Tipo de fibra**

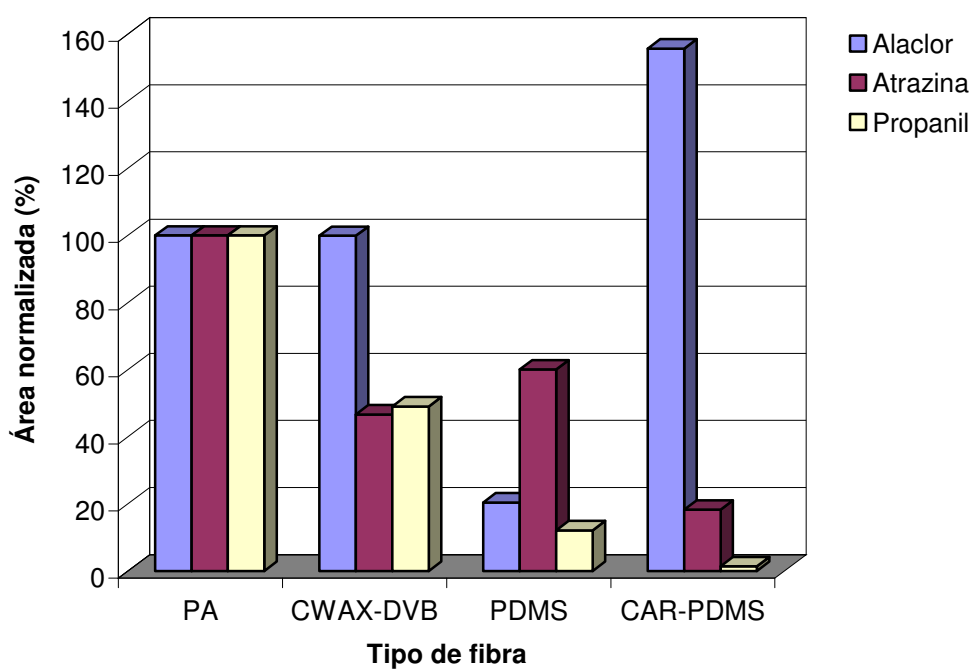
A sensibilidade de um método de SPME depende de uma seleção correta do revestimento e do tipo da fibra, a respeito do composto de interesse (CANCHO et al., 2001; LORD et al., 2000). Diversos autores têm utilizado as fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) e poliacrilato (PA) para determinação de herbicidas em água (DUGAY et al. 1998; BELTRAN et al., 2000; LAMBROPOULOU et al., 2001), um estudo recente para a determinação de vários herbicidas (incluindo alaclor e atrazina) em amostras de água de rio por SPME e GC-MS, demonstraram que a fibra de poliacrilato (85  $\mu\text{m}$ ) apresentou melhor desempenho do que a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS, 100  $\mu\text{m}$ ).

KOMATSU et al. (2004) otimizaram os parâmetros para determinação de multi-resíduo de pesticida em água de rio e avaliaram diferentes tipos de fibras (PDMS, carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), carbowax/divenilbenzeno (CW/DVB) e poliacrilato (PA), concluíram que a fibra com melhor desempenho para o herbicida atrazina foi a de poliacrilato (85  $\mu\text{m}$ ). Neste estudo as fibras de polidimetilsiloxano (PDMS, 100  $\mu\text{m}$ ), PA (85  $\mu\text{m}$ ), CAR/PDMS (75  $\mu\text{m}$ ) e CW/DVB

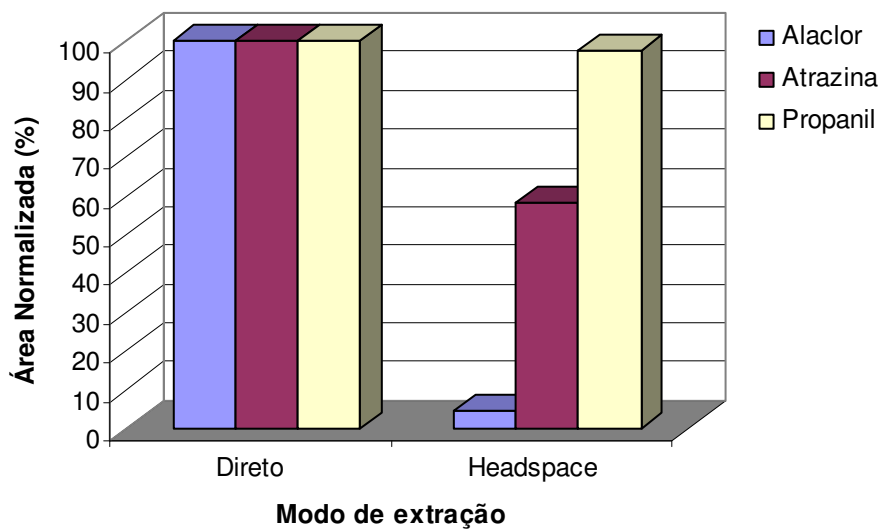
(65  $\mu\text{m}$ ) tiveram suas eficiências de extração para alaclor, atrazina e propanil comparadas. Conforme é mostrado na **Figura 12**, a fibra que apresentou melhor desempenho no estudo foi de poliacrilato (PA) 85  $\mu\text{m}$ , a qual foi selecionada para os experimentos posteriores.

#### **5.1.1.2 Modo de extração**

O modo HS-SPME (**Figura 13**) não apresentou bons resultados para dois dos herbicidas estudados (alaclor e propanil), provavelmente devido à alta polaridade e baixa volatilidade destes compostos. Desta maneira o modo de extração direto foi selecionado. Cabe enfatizar que eficiência de cada modo de extração depende das propriedades dos analitos e da matriz. Em geral, o DI-SPME é mais sensível que a HS-SPME para analitos presentes em amostras líquida. No entanto, compostos não voláteis presentes na amostra ficam retidos na fibra, podendo reduzir a sua vida útil e a repetitividade de extração (KATAOKA et al., 2000).



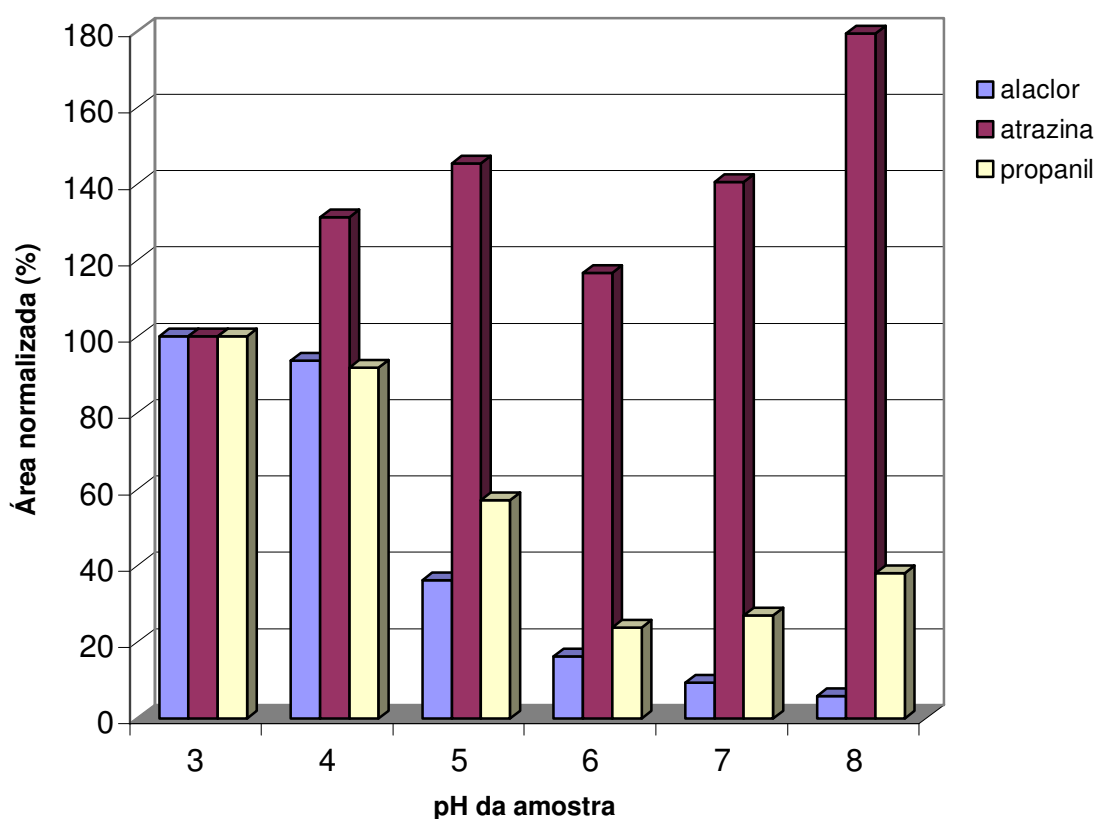
**Figura 12:** Resultado obtido da otimização para o tipo de fibra



**Figura 13:** Resultados obtidos da otimização para modo de extração

### 5.1.1.3 Influência do pH

Segundo GONÇALVES et al. (2002), a afinidade dos analitos para o adsorvente age primeiramente por interações hidrofóbicas podendo ser ativada mantendo as moléculas nas formas não ionizadas. Desde modo, a influência do pH (3, 4, 5, 7 e 8) sobre a eficiência de extração dos herbicidas alvos deste estudo foi verificada. A **Figura 14** demonstra que para os herbicidas estudados, os mais afetados pela variação do pH foram os herbicidas alaclor e propanil, que tiveram sua extração diminuída em pH mais básico. Desta maneira o pH 4 foi selecionado.

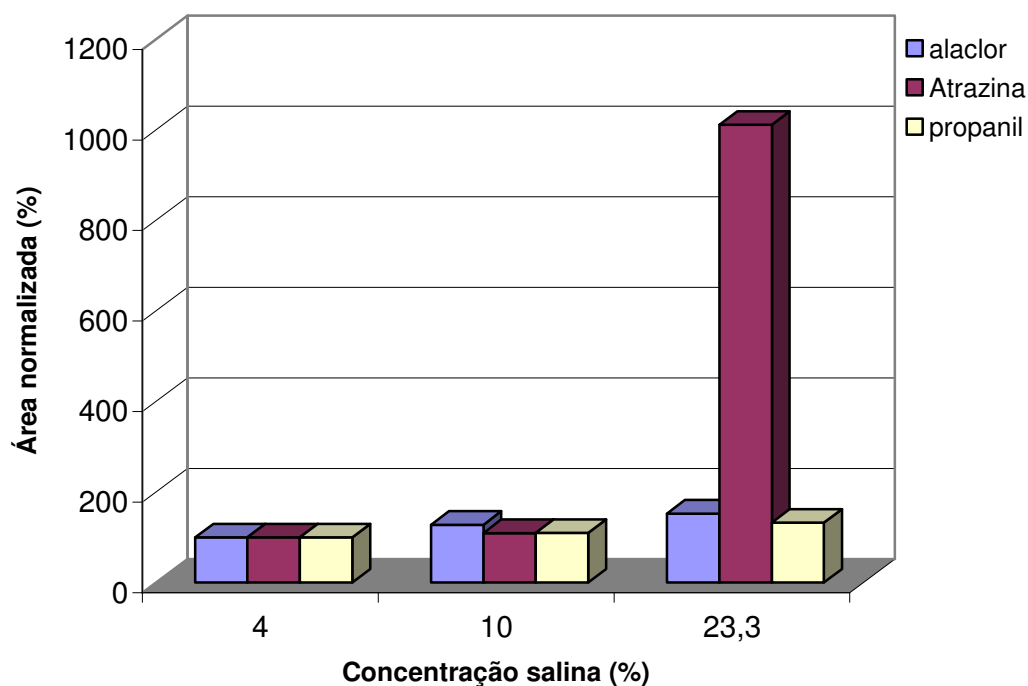


**Figura 14:** Resultado obtido da otimização para o pH da amostra

#### 5.1.1.4 Influência da adição de sal

É bem conhecida que o processo de sorção dos compostos é afetado pela força iônica da solução, ajustada pela adição de sal. Desta maneira, a adição de sal na amostra foi testada para verificar a melhor condição para extração dos analitos de interesse.

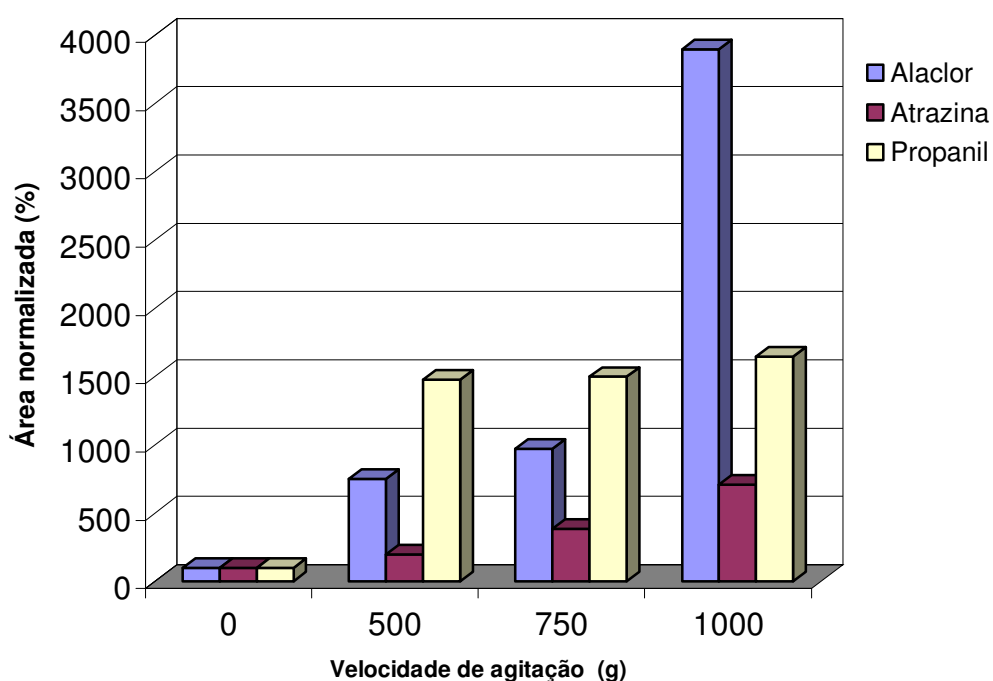
Os resultados deste estudo são apresentados na **figura 15**. Nota-se que apesar do herbicida atrazina ter apresentado melhores resultados na eficiência de extração com a adição de 30% de NaCl em relação aos outros herbicidas. Optou-se por utilizar a concentração de 10% de sal.



**Figura 15:** Resultado obtido da otimização para a influência da concentração salina na extração da amostra.

#### 5.1.1.5 Velocidade de agitação da amostra

De acordo com alguns trabalhos (GONÇALVES et al., 2002; KOMATSU et al., 2004) a velocidade de agitação é utilizada para facilitar o transporte de massa entre a fase aquosa e a fibra. A **figura 16** demonstrou a eficiência da extração em relação velocidade de agitação. Optou-se pela agitação de 750 g devido às condições laboratoriais.



**Figura 16:** Resultado obtido da otimização para a velocidade de agitação da amostra.

#### 5.1.1.6 Temperatura da amostra

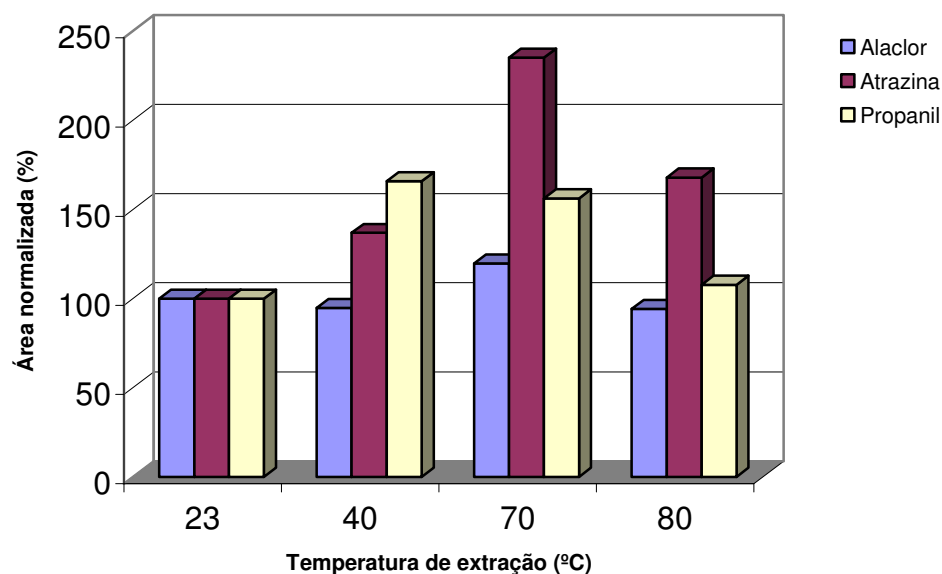
A maioria dos autores concorda com a importância da temperatura de extração por SPME para pesticida e recomendam empregar temperaturas até 100°C dependendo do pesticida em estudo e do tipo de matriz (BELTRAN et al.,



2000; LORD et al., 2000; CORREIA et al., 2000). Ou seja, variações de temperatura afetam a cinética e a termodinâmica do processo de extração (GONÇALVES et al., 2002).

De acordo com ALPENDURADA. (2000), a temperatura de extração tem dois efeitos opostos na extração de SPME. Aumentando-se o coeficiente de difusão dos analitos e, em contrapartida, como o processo de extração é um processo exotérmico, o aumento da temperatura representa uma redução no coeficiente de distribuição dos analitos. **Figura 17** pode-se observar que os comportamentos dos herbicidas analisados não são extremamente coincidentes, uma vez que estes compostos podem apresentar diferentes pressões de vapor, que pode ter influenciado no coeficiente de distribuição entre a fibra e os analitos.

De maneira a escolher uma temperatura média que fornecesse maiores valores de área para a maioria dos analitos, na **Figura 17** a qual indicou que a temperatura de 70°C apresenta os melhores resultados para o processo de extração. Na literatura há relatos que, temperaturas muito elevadas podem ser prejudiciais para extração dos pesticidas clorados, pois em elevadas temperaturas o efeito da temperatura que favorece a taxa de transferência dos analitos ao revestimento da fibra é superado por seu efeito negativo no coeficiente de partição dos analitos entre a fibra e a matriz da amostra (GONÇALVES et al., 2002; OLIVARES, 2006).



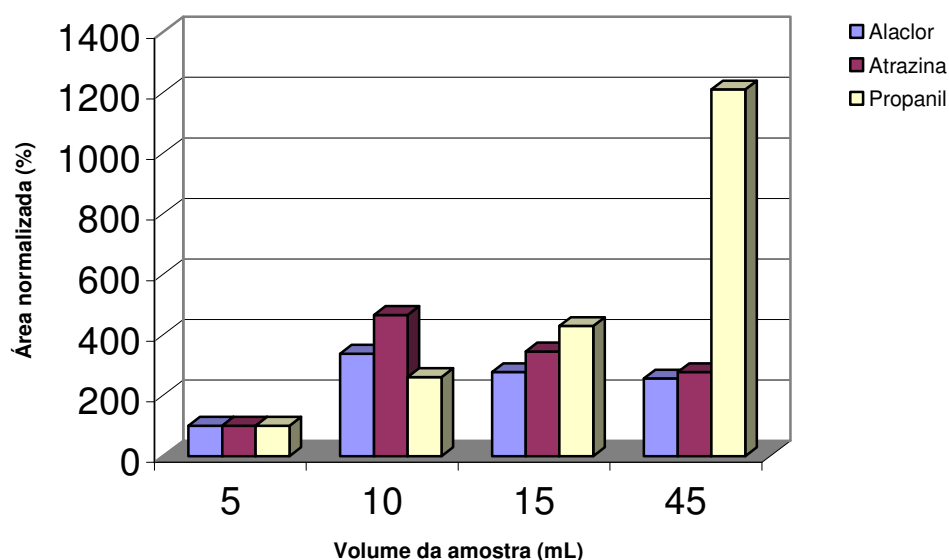
**Figura 17:** Resultado obtido da otimização para a temperatura de extração da amostra.

#### 5.1.1.7 Volume da amostra

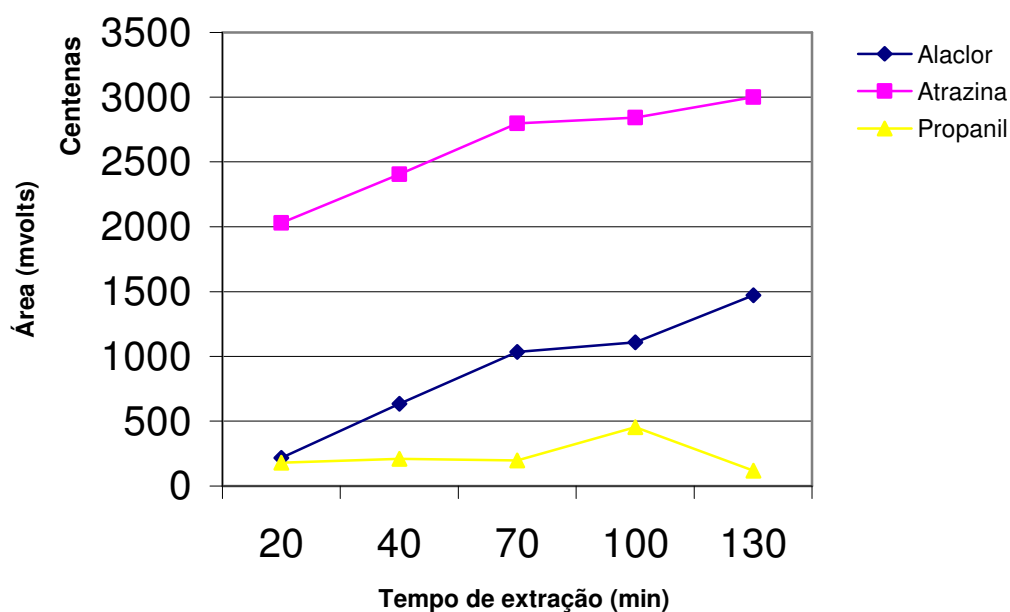
O volume da amostra é um parâmetro importante na otimização por SPME porque está relacionado diretamente com a sensibilidade do método (PAWLISZYN, 1997). A **Figura 18** demonstra os resultados obtidos para os volumes otimizados. Segundo KRUTZ et al. (2003) geralmente, a quantidade de analito absorvida na fase estacionária aumenta quando o volume da amostra aumenta, em conseqüentemente a sensibilidade também aumenta (KRUTZ et al., 2003). Poucos estudos relatam otimização de volume da amostra por SPME. Em alguns estudos onde volume de amostra foi testado, os melhores volumes encontrados ficaram entre 4 e 120 mL (GONZÁLEZ-BARREIRO et al., 2000).

#### 5.1.1.8 Tempo de extração

Após a otimização do tipo de fibra (PA), modo de extração (direto), pH da amostra (4), concentração salina (10 %), velocidade de agitação (750 g ), e volume (15 mL) e temperatura (70°C), foi estudado o tempo de extração no intervalo de 20 a 130 min. Uma vez que a extração dos analitos em SPME é baseada no equilíbrio entre o processo de distribuição, o tempo de equilíbrio foi estudado com objetivo de obter a maior quantidade extraída do analito pela fibra. As respostas encontradas para os diferentes analitos, uma vez que o tempo de equilíbrio na extração também está relacionado com a volatilidade e estrutura de cada um dos herbicidas estudados. A **Figura 18** apresenta os resultados deste estudo, para os volumes de amostras estudados.



**Figura 18:** Resultado obtido da otimização para o volume da amostra.



**Figura 19:** Resultado obtido da otimização para o tempo de extração da amostra.

#### 5.1.1.9 Efeito de memória

O método baseado na SPME pode estar sujeito a efeitos de memória. Estes efeitos são caracterizados pela dessorção incompleta dos analitos adsorvidos na fibra, podendo ser mais acentuado em compostos com maior afinidade pelo recobrimento da fibra (PAWLISZYN, 1997). A associação adequada do tempo e temperatura de dessorção da fibra injetor, tempo de *splitless*, a programação de temperatura da coluna é de vital importância para análise em SPME, uma vez que esta associação pode encaminhar os analitos através de uma condição adequada ao detector para obtenção um melhor sinal (OLIVARES, 2006).

A temperatura do injetor utilizado foi 280°C, uma vez que temperaturas maiores poderiam diminuir a vida útil da fibra e do septo do cromatógrafo. O tempo

de dessorção adotado foi de 5 minutos, uma vez que neste tempo não foi observado efeito *carry-over*. (**Tabela 8**).

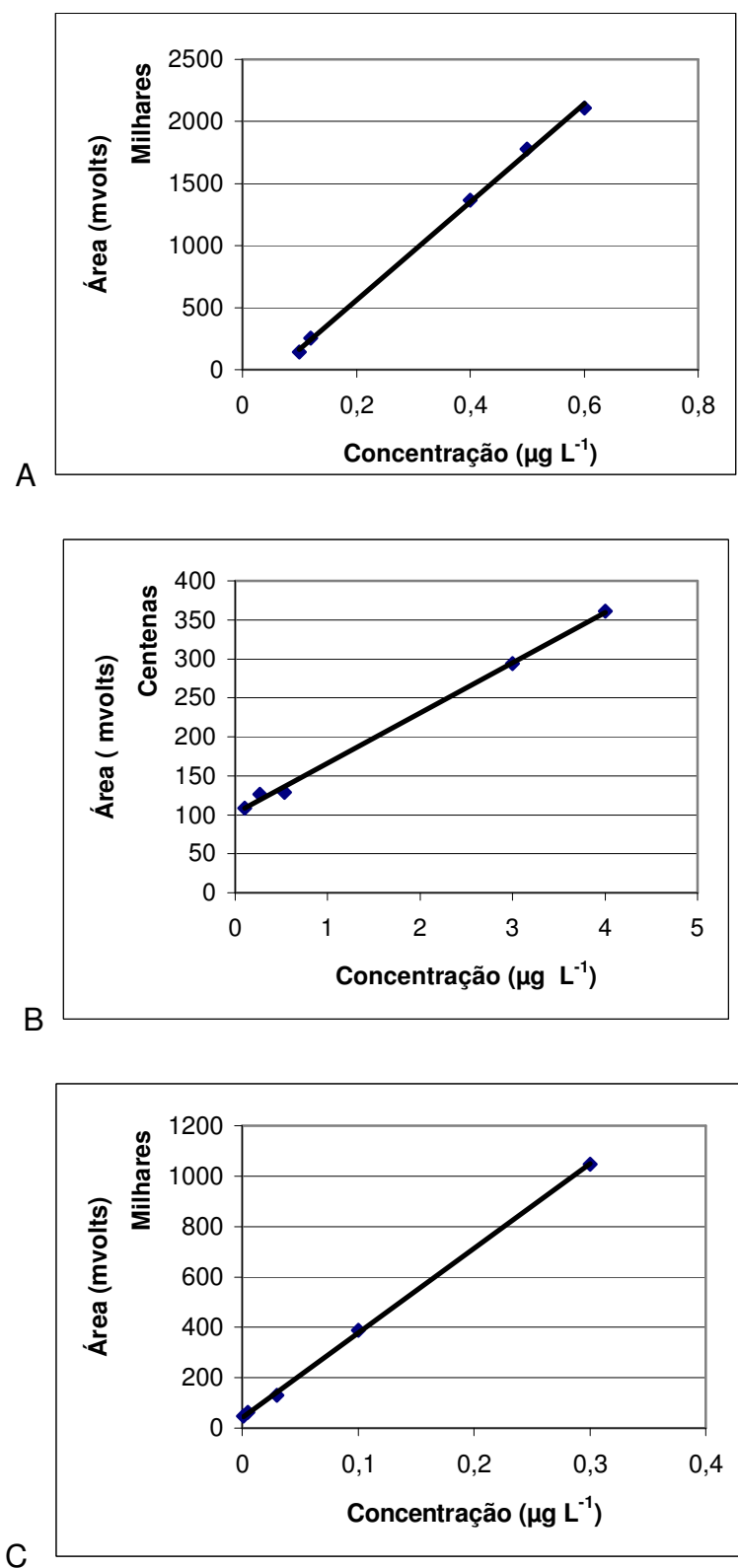
**Tabela 8:** Porcentagem de resíduos que permanecem na fibra após os três tempos de dessorção.

Tempo de dessorção	3 min			5 min			10 min		
	1*	2*	3*	1*	2*	3*	1*	2*	3*
Herbicida									
Alaclor	100	0,63	0,42	100	1,32	0	100	0	0
Atrazina	100	0,77	0,36	100	0,57	0,3	100	0,39	0,30
Propanil	100	2,47	2,63	100	4,89	0	100	0	0

\* 1; 2; 3 = repetições.

### 5.1.2 Validação da metodologia

Para validação foram avaliadas as linearidades dos herbicidas. **Figura 22** observa-se às curvas de calibração obtidas para os compostos estudados. A faixa linear encontrada foi de 0,1 a 0,6, 0,1 a 4  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,0015 a 0,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  para alaclor, atrazina e propanil, respectivamente. Todos os herbicidas apresentaram bons coeficientes de correlação, todos acima de 0,99. Os valores obtidos para o Limite de detecção (LOD) de 0,0023, 0,02 e 0,005  $\mu\text{g L}^{-1}$ , Limite de quantificação(LOQ), 0,07, 0,06 e 0,016  $\mu\text{g L}^{-1}$  para alaclor, atrazina e propanil, respectivamente.



**Figura 20:** Linearidade obtida para os herbicidas: (A) alaclor; (B) atrazina e (C) propanil.

Na literatura são encontrados valores de limites de detecção pela técnica de SPME para determinação de herbicidas em água. Segundo os autores foram encontrados limites de detecção com teores de 0,01; 0,02; 0,03 e 0,27  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o herbicida alaclor (RAMSEH et al., 2006; LABROPOULOU et al., 2002; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2003; GONZALEZ-BARREIRO et al., 2000). Quando foram utilizadas outras técnicas os limites de detecção para alaclor variaram de 0,0035  $\mu\text{g L}^{-1}$  pela técnica de microextração por microgota (ZHAO et al., 2006), de 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$  pela técnica de microextração fase líquida (LI et al., 2003) e de 0,024  $\mu\text{g L}^{-1}$  por SPE (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2000).

Limites de detecção para herbicida atrazina em amostras de água usando a técnica de SPE, valores encontrados na literatura de 0,001; 0,005; 0,01 a 0,04; 0,02; 0,04 e 0,06  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. (GONÇALVES et al., 2002; LAMBROPOULOU et al., 2002; BOUAID et al., 2001; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2003; KAMATSU et al., 2004; DUGAY et al., 1998). Quando utilizada a técnica de SPE os limites de detecção encontrados foram de 0,004; 0,008; e 0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$  (MARTINEZ – CARABIAS et al., 2000; BOSSI et al., 2002; CARABIAS-MARTINEZ et al., 2002).

NATANGELO et al. (1999), em estudo realizado com amostras de água para consumo humano conseguiram limites de detecção para o propanil de 0,002  $\mu\text{g L}^{-1}$  utilizando a técnica de SPME. Outros autores também analisaram água, sendo a técnica utilizada de SPE, os limites encontrados foram mais altos (0,07, 0,08 e 0,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em relação a técnica de SPME (MUÑOZ DE LA PENA et al., 2003; CHANCHO et al., 2001; LORD et al., 2000).

Trabalhos publicados na literatura sobre faixas lineares encontradas para os herbicidas alaclor, atrazina e propanil em que os autores utilizaram a técnica de

SPME. Para o alaclor as faixas encontradas de 0,05 a 2,0; 2 a 50; 0,25 a 5; 0,05 a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente (CARABIAS – MARTINEZ et al., 2003; HOU et al., 2003; CARABIAS – MARTÍNEZ et al., 2000; LAMBROPOULOU et al., 2002), 15 a 60  $\mu\text{g L}^{-1}$  (GONZÁLES – BARREIRO et al., 2000).

As faixas lineares encontradas para atrazina foram de 0,01 a 1,0; 0,05 a 10; 0,05 a 2,0 ; 0,12 a 10,88 ; 0,1 a 10; 0,25 a 6 0; 25 a 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente (GONÇALVES et al., 2002, LAMBROPOULOU et al., 2002; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2003; KOMATSU et al., 2004; BOUAID et al., 2003; CARABIAS – MARTÍNEZ et al., 2002; CARABIAS – MARTÍNEZ et al., 2000).

Para o propanil faixas lineares encontradas foram de 0,2 a 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,2 a 1,6 e de 4,0 a 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (MUÑOZ DE LA PEÑA et al., 2003).

A recuperação foi realizada em água destilada em duas concentrações diferentes para cada herbicida, e os resultados obtidos estão mostrados na **Tabela 9**. Para o alaclor a recuperação variou de  $75,4 \pm 18,1$  a  $116,9 \pm 17,3\%$ , para atrazina de  $76,1 \pm 6,7$  a  $106,7 \pm 14,3\%$  e o propanil de  $96,2 \pm 19,2$  a  $103,9 \pm 21,2\%$ .

Os valores de recuperação encontrados para o alaclor utilizando a técnica de SPME em amostras de água de  $105 \pm 10\%$ ;  $88 \pm 9,7\%$ ;  $102 \pm 4,8\%$  e  $89\%$  (CARABIAS-MRTÍNEZ et al., 2003; ZHAO et al., 2006; LOMBROPULOU et al., 2002). Valores de recuperação semelhantes foram encontrados utilizando a técnica de microextração em fase líquida de  $91,5\%$  (HOU. Et al., 2003) e  $74$  e  $89\%$  por SPE (CARABIAS-MARTNEZ et al., 2000). Para a atrazina os valores de recuperação por SPME foram de  $97 \pm 7$  a  $107 \pm 17$ ;  $74\%$ ;  $104 \pm 16$ ;  $103,4$ ;  $110\%$ , respectivamente (KOMATSU et al., 2004; BOUAID et al., 2001), (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2003), (LAMBROPOULOU et al., 2002) (GONÇALVES et al., 2002). Quando a



técnica utilizada foi EFS os valores de recuperação encontrados de  $90,5 \pm 6,5\%$  a  $100,7 \pm 4,9\%$  (BERNHARDT et al., 2004; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2002).

**Tabela 9:** Recuperação dos herbicidas em água destilada para o método proposto.

Herbicida	Recuperação				
	Conc. Teórica <sup>c</sup>	Conc. Exp. <sup>c</sup>	DP <sup>a</sup>	%	DPR <sup>b</sup>
Alaclor	0,147 <sup>d</sup>	0,17	0,03	116,9	17,3
	0,27	0,20	0,04	75,4	18,1
Atrazina	0,75	0,57	0,04	76,1	6,7
	3,00	3,20	0,46	106,7	14,3
Propanil	0,017	0,015	0,003	96,2	19,2
	0,032	0,035	0,007	103,9	21,2

<sup>a</sup> Desvio padrão <sup>b</sup> Desvio padrão relativo <sup>c</sup>  $\mu\text{g L}^{-1}$  <sup>d</sup> n = 3

Valores de desvio padrão relativo (DPR) encontrados na literatura para alaclor atrazina e propanil em que os autores utilizaram a técnica de SPME. Alaclor de 11; 16 e 20,2% (LAMBROPOULOU et al., 2002; GONZÁLEZ-BARREIRO et al., 2000; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2003). A atrazina de 8; 9,4; 20 e 25,6% (LAMBROPOULOU et al., 2002; GONÇALVES et al., 2002; BOUAID et al., 2001; BAGHERI et al., 2003). Propanil foi encontrado valor menor de DPR, 1,6% (MUÑOZ DE LA PEÑA et al., 2003).

### 5.1.3 Amostras coletadas nos rios

O método descrito foi aplicado para extração dos herbicidas em amostras de águas superficiais dos rios: Amola Faca; Itoupava; Jundiá e Manoel Alves. Total de 82 amostras, coletadas nos municípios de Turvo e Meleiro, região sul do estado. Analisadas por GC-ECD e confirmadas no GC-MS. **Tabela 10** pode ser observada o total de amostras coletadas nos rios e número de amostras contaminadas pelos herbicidas alaclor, atrazina e propanil.

**Tabela 10:** Número de amostras coletadas e amostras contaminadas por rio e os herbicidas estudados.

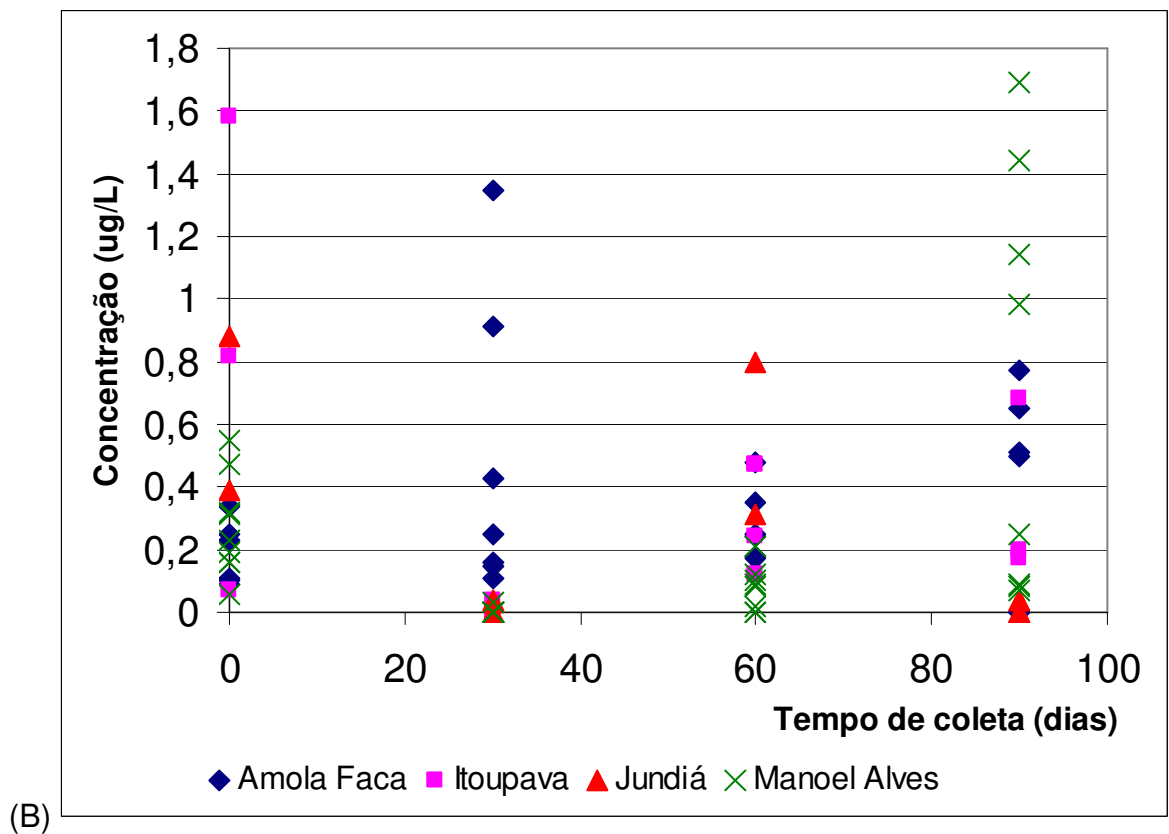
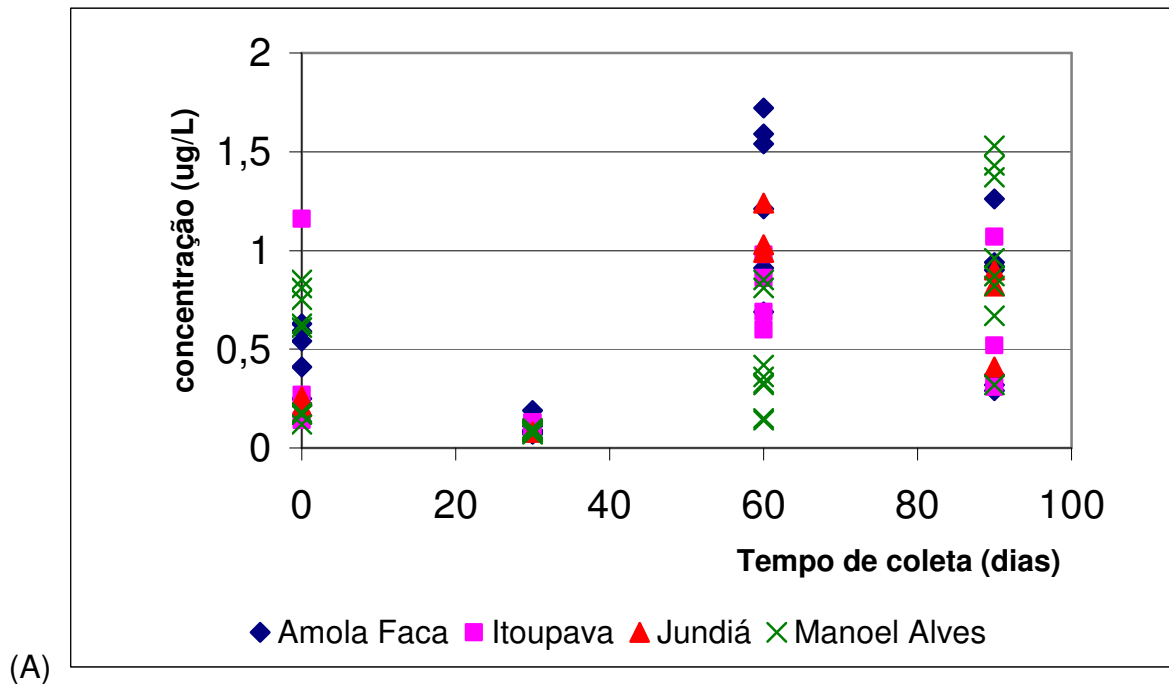
RIO	Nº de Amostras coletadas	Herbicidas detectados		
		Alaclor	Atrazina	Propanil
A. Faca	26	26	0	23
Itoupava	14	14	0	11
Jundiá	11	11	0	8
M. Alves	31	31	0	24
Total	82	82	0	66

Resultados encontrados para os herbicidas, a atrazina não foi detectada com teores acima do LOQ do método em nenhuma das amostras analisadas. Não há relatos na literatura sobre a aplicação da atrazina em culturas de arroz irrigado, sendo mais aplicado em cultura de milho, soja e algodão (SIA, 2007). A região onde

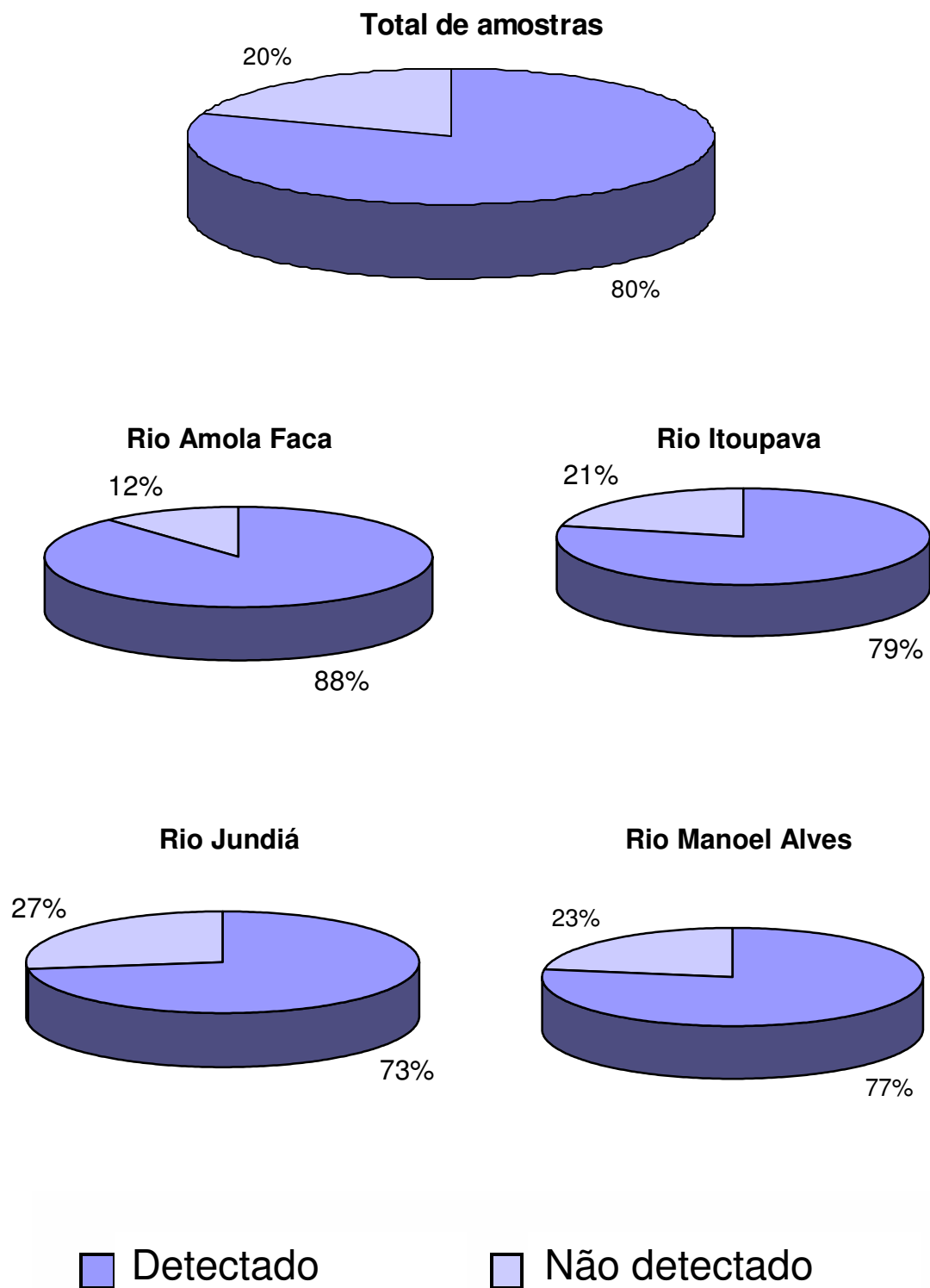
as amostras foram coletadas predomina-se o cultivo de arroz irrigado, talvez isto justifique porque não foi encontrada atrazina em nenhuma das amostras.

O herbicida alaclor estava presente em todas as amostras analisadas e os níveis de contaminação variavam de 0,07 até 1,72  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Conforme a **Figura 21** os teores deste herbicida variaram de 0,07 a 1,16; 0,07 a 0,19; 0,14 a 1,72; e 0,31 a 1,53  $\mu\text{g L}^{-1}$  para todas as coletas realizadas. O alaclor tem sido aplicado em monoculturas como milho, soja, amendoim, tem crescido nos últimos anos, principalmente quando associado a outros herbicidas sistêmicos. Quanto à persistência, estudos de campo mostram que a meia vida do alaclor varia entre no mínimo de 22 dias a um máximo de 320 dias para solos em condições de incubação aeróbias e anaeróbias, respectivamente (CÁSSIA, et al. 1999).

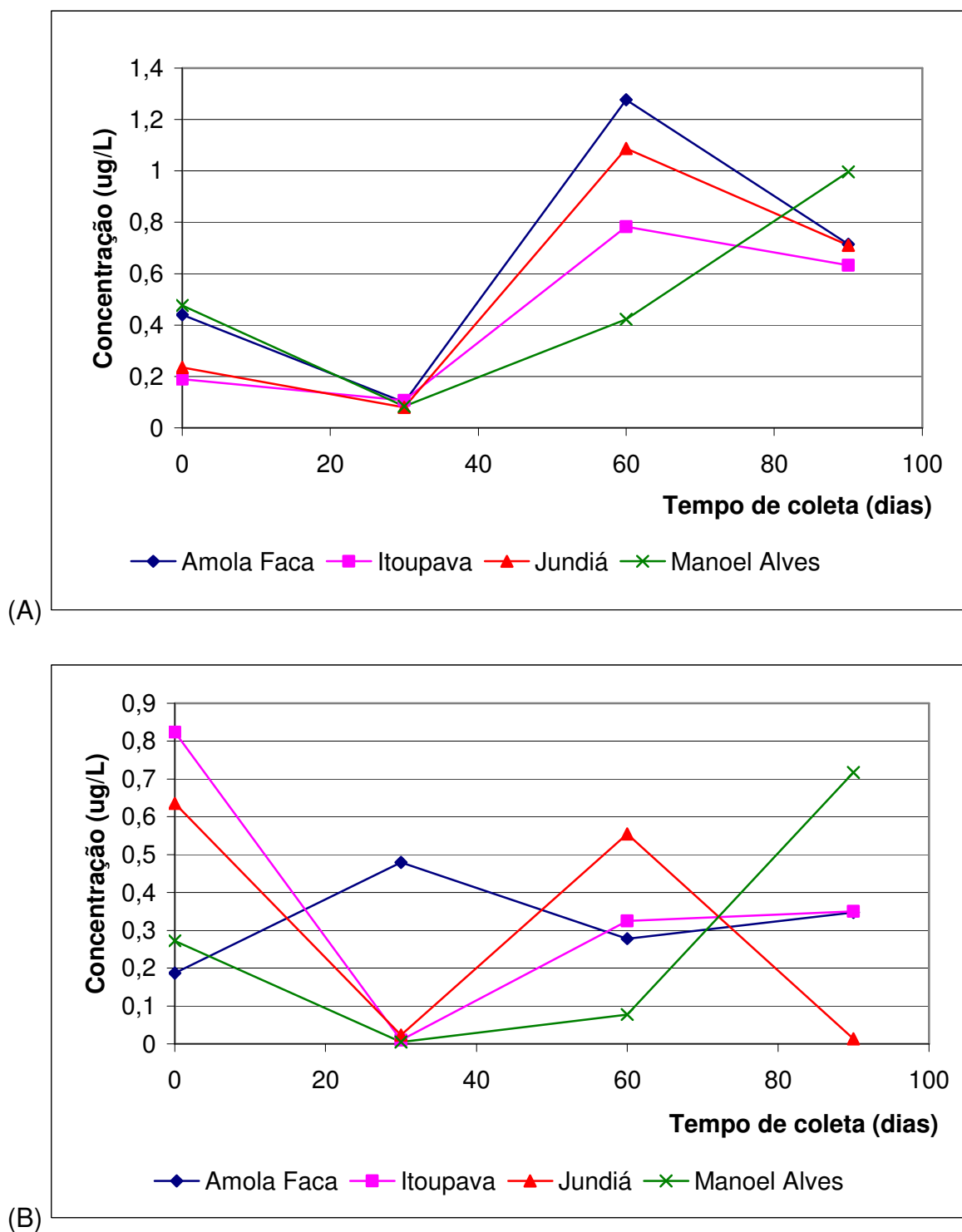
Nas **Figura 21** e **Figura 22** é possível observar que 80% das amostras analisadas estavam contaminadas com propanil e os teores encontrados variaram de 0,02 a 1,69  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A porcentagens de contaminação e os teores encontrados nas amostras analisadas pelo herbicida para cada rio foram de 0,09 a 1,35; 0,04 a 1,58; 0,03 a 0,80; 0,02 e 1,69  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente, Amola Faca (88%), Itoupava (79%), Jundiá (73%) e Manoel Alves (77%). Quanto às coletas realizadas, na primeira foram encontrados propanil com teores que variaram de 0,07 a 1,58  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e estava presente em todas as amostras analisadas. Na segunda, os teores encontrados foram de 0,03 a 1,35  $\mu\text{g L}^{-1}$  e não foi detectado o herbicida em 9 amostras. A terceira os teores encontrados variaram de 0,02 a 0,80  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo que não foi detectado em duas amostras. Na ultima coleta os teores encontrados foram de 0,04 a 1,69  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e o propanil não foi detectado em 5 amostras analisadas. A concentração media dos herbicidas alaclor e propanil encontrados em cada rio e nas quatro coletas realizadas podem ser observado na **figura 23**.



**Figura 21:** Concentrações encontradas de (A) Alaclor e (B) propanil em cada coleta realizada por rio e meses: (0) Fevereiro, (30) Março, (60) Abril e (90) Maio de 2007 respectivamente.



**Figura 22:** Porcentagem das amostras detectadas e não detectadas do herbicida propanil nos quatro rios.



**Figura 23:** Concentrações médias de (A) Alaclor e (B) propanil por rio e coleta realizada nos meses: (0) Fevereiro, (30) Março, (60) Abril e (90) Maio de 2007.

As concentrações médias para os herbicidas alaclor e propanil encontradas em cada coleta nos quatro rios esta demonstrada na **Figura 24**.

Os fatores abióticos que podem ter contribuído para a contaminação das águas superficiais, deve-se considerar que a região onde as amostras foram coletadas as temperaturas do ar são elevadas nesta época do ano (médias de 19 a 22°C). As chuvas concentram-se nos meses de janeiro, fevereiro, março e setembro. Período este, que são desenvolvidas as culturas de fumo e arroz irrigado, desta forma coincidem com período de aplicação dos pesticidas (EPAGRI, 2007).

Quanto aos herbicidas estudados, o propanil e pendimetalina (dinitroanilinas) são aplicados em cultura de arroz irrigado, no entanto existem outras culturas como fumo, banana, feijão, abóbora e milho que também são aplicados herbicidas (EPAGRI, 2007). Geralmente o período em que se faz uso de pesticidas (vários) na região são os meses de junho a fevereiro, sendo que a maior intensidade de uso dos herbicidas são de setembro a novembro período em que é preparado o solo para o plantio de arroz irrigado.

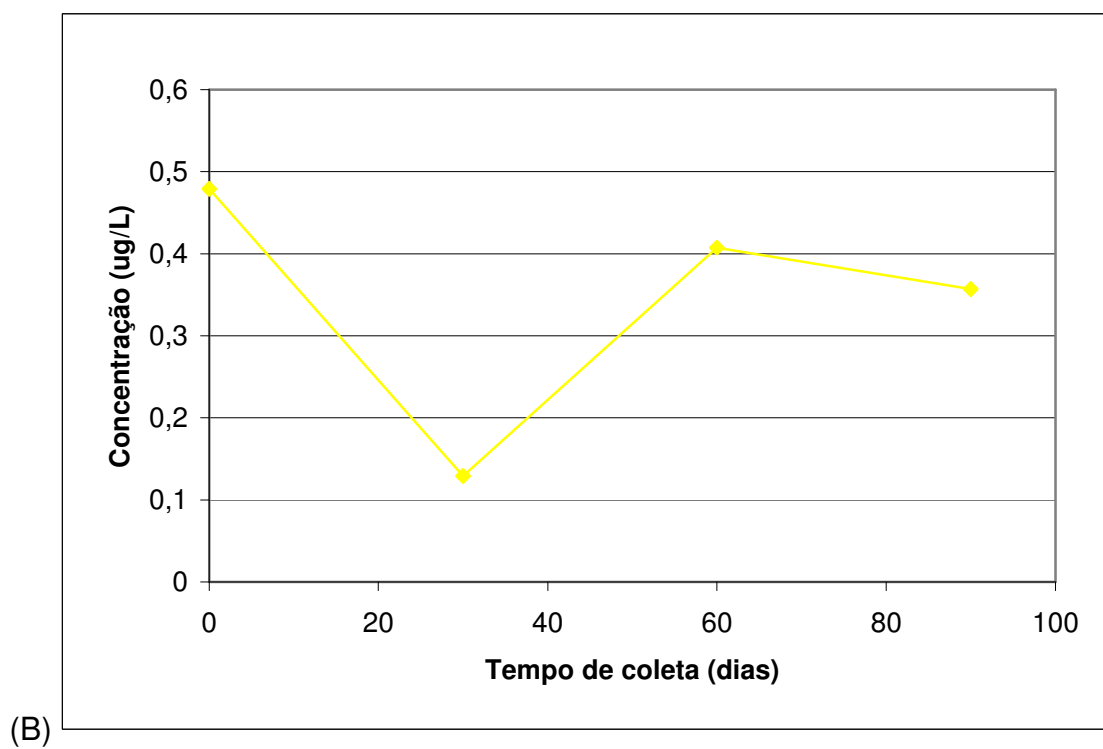
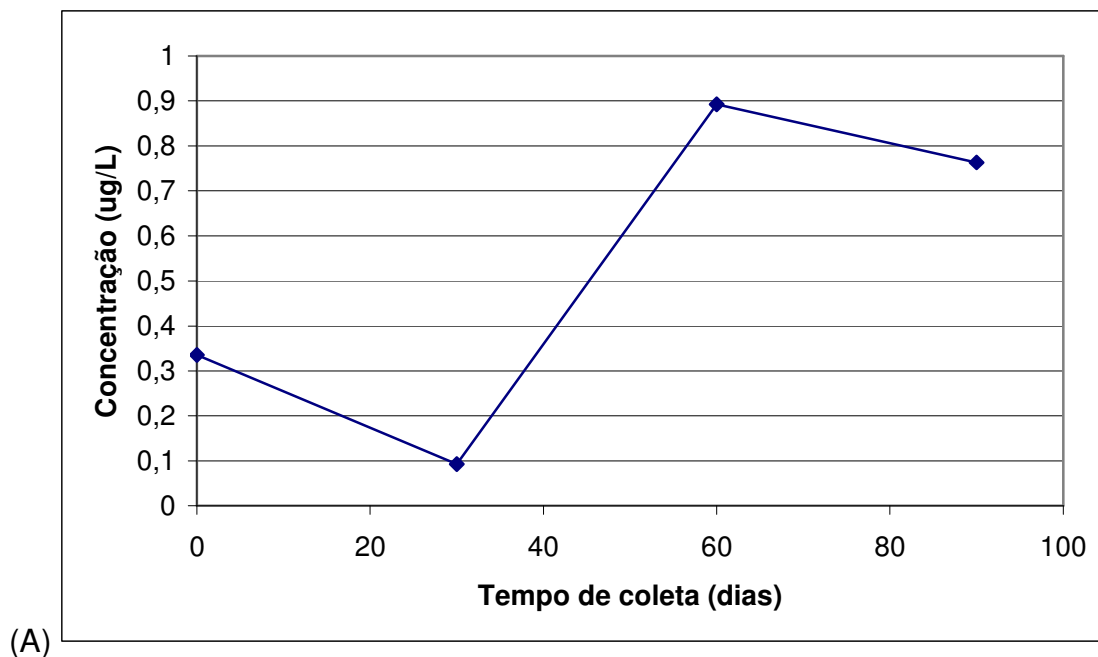
A temperatura do ar no período da primeira, segunda e terceira coleta 25 a 28°C, enquanto na quarta e última coleta a temperatura estava mais baixa 19°C para época. Estes dados foram verificados *in loco* nos termômetros nas cidades de Turvo e Meleiro nos dias de coletas das amostras. Quanto às chuvas na região no período de janeiro a maio/2007, segundo dados da EPAGRI/CIRAN (2007), fevereiro choveu 13 dias máxima no dia 24, total 185,2 (mm), março 15 dias de chuva, máxima dia 18, total 181,4(mm), abril 8 dias de chuva, máxima no dia 1, total 116,2 (mm), na ultima coleta no mês de maio 12 dias de chuva, máxima dia 14, total 187,5 (mm).

Em eventos extremos de chuva intensificam-se tanto os transportes de pesticida por carreamento superficial como por lixiviação. A ocorrência de chuvas intensas poucas horas após a aplicação dos pesticidas é comum, o que torna sua movimentação a partir da área de aplicação altamente provável (LAABS et al., 2002)

As amostras foram coletadas no início de fevereiro, e a última no início de maio, período este que coincidiu com o início do plantio e a colheita do arroz, época de bastante chuva e temperaturas bastante elevadas para as três primeiras coletas, na última coleta choveu pouco durante o mês, e as temperaturas estavam mais baixas.

Segundo HADLICH (1997), partes dos pesticidas aplicados durante a safra, são absorvidos pelas argilas contidas no solo, ou quando ali depositados permanecem expostos às inúmeras reações químicas, físicas e biológicas. Quanto mais pobre for o solo com relação à presença da matéria orgânica, mais fenômeno de absorção se sobressai sobre os demais. Desta forma, sabe-se que aplicação destes produtos é perceptível pelo odor característico que se constata em cidades como Turvo e Meleiro. Geralmente, a população costuma atribuir os elevados níveis de turbidez dos rios, principalmente na época do preparo das canchas de arroz, a contaminação por pesticidas utilizados na lavoura.





**Figura 24:** Concentração média encontrada por coleta realizada. (A) alaclor (B) propanil. (0) Fevereiro, (30) Março, (60) Abril e (90) Maio de 2007.

Ainda são poucos os trabalhos publicados que dão ênfase para extração de pesticidas em águas superficiais, citados na literatura onde autores analisaram água por SPME. LAMBROPOULOU et al. (2002) em estudo realizado na Espanha analisaram água de rio (Kalamas) detectaram atrazina e alaclor em concentrações médias de 0,05 a 0,008  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

Outro estudo realizado em água de rio e águas subterrâneas na Espanha foi detectada a presença de atrazina e os teores de 0,74 a 0,99  $\mu\text{g L}^{-1}$  (CARABIAS-MARTÍNEZ et al. (2003). LAMBROPOULOU et al. (2000) detectaram a presença de atrazina em amostras de água de rio (Kalamas) com teores de 0,002 a 0,23  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Em 2006, KONSTANTINOU et al. (2006) publicaram uma revisão para avaliar os níveis de contaminação por pesticidas das águas de rios no período de 1993 a 2004, das várias amostras analisadas, 23% apresentaram contaminação por atrazina e as concentrações encontradas foram de 0,002 a 0,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ . CARABIAS-MARTINEZ et al. (2003) analisaram amostras de água de rio para extração de herbicidas usando a técnica de SPME, sendo que foi detectada a presença de alaclor nas amostras analisadas mas não foi detectada a presença de atrazina em nenhuma das amostra.

## **5.2 DETECÇÃO DE PENDIMETALINA POR SPME-GC-ECD EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DE RIOS, PRÓXIMOS DAS CULTURAS DE ARROZ IRRIGADO.**

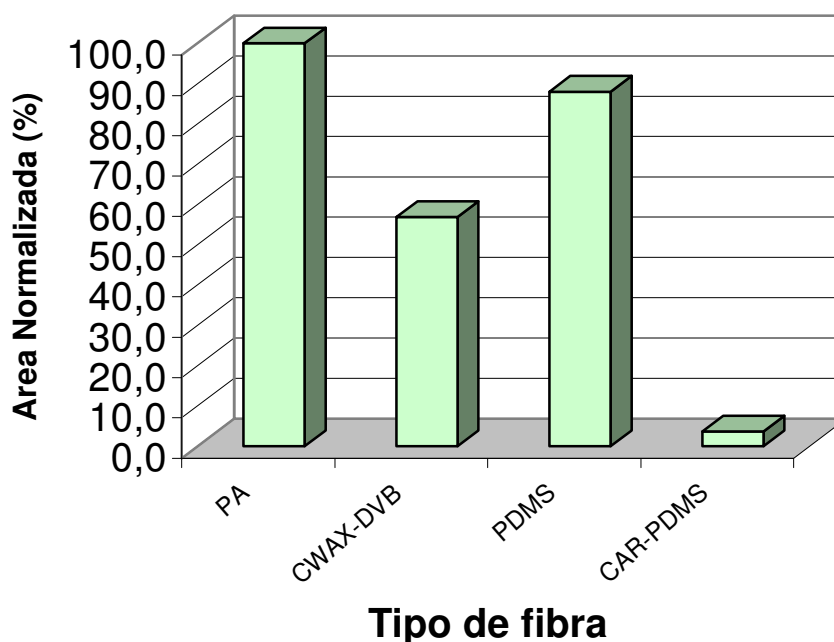
Considerando as inúmeras variáveis experimentais que podem influenciar no procedimento de extração dos analitos, uma padronização dessas variáveis é de suma importância para melhorar a eficácia do processo de extração. Essa padronização pode ser realizada de maneira univariada, ou seja, avaliando os fatores um a um. Nesta situação todos os fatores são fixados, com exceção do fator que vai ser variado, até encontrar o valor ótimo para este parâmetro. Em seguida, mantendo-se este fator no nível ótimo encontrado, variam-se os demais fatores sucessivamente um a um até que todos sejam padronizados.

### **5.2.1 Otimização do procedimento de SPME**

Para a determinação de pendimetalina foram avaliados os parâmetros tipo de fibra, modo de extração, tempo e temperatura de extração, pH e concentração salina da amostra, velocidade de agitação da amostra e tempo de dessorção. Como procedimentos iniciais de padronização da metodologia fixaram-se algumas variáveis e deu-se início a padronização utilizando água milli-Q com um volume da amostra de 15 mL, modo de extração direto, tempo de extração de 40 min; agitação de 750 g: pH da amostra 8; temperatura 70°C. Após cada variável otimizada, foi definido e fixado o melhor resultado.

### 5.2.1.1 Natureza da fibra

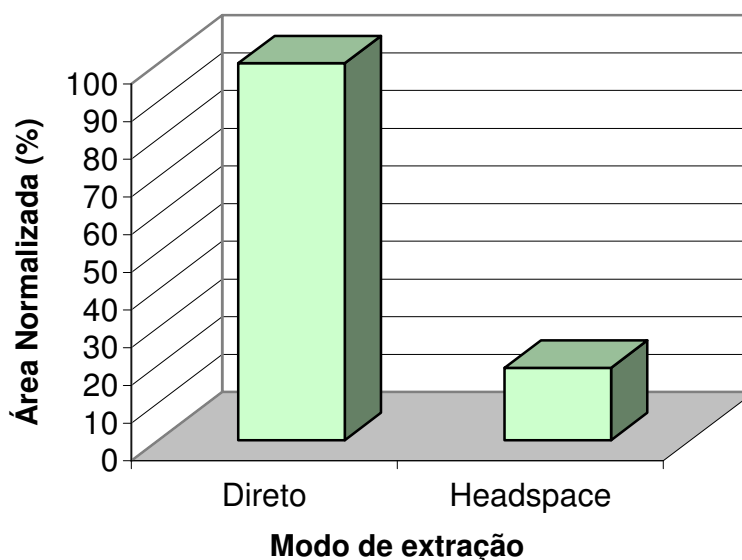
Foram testadas 4 diferentes tipos de fibras comerciais: poliacrilato (PA, 85 $\mu$ m), carboxen/divinilbenzeno (CWAX-DVB; 65  $\mu$ m), polidimetilsiloxano (PDMS, 100  $\mu$ m), e carbovox/polidimetilsiloxano (CAR-PDMS, 75 $\mu$ m) para a extração de pendimetalina em amostras de água superficiais. Pode ser verificado através da **Figura 25** que as fibras que apresentaram os melhores valores de extração do analito foram a PA e de PDMS, estes resultados são concordantes com GUAN et al. (1998). Na literatura há relatado que para as dinitroanilinas são analisadas utilizando fibra PDMS e PA (KRUTZ et al., 2003). Das fibras testadas CAR-PDMS e CWAX-DVB não apresentaram bons resultados de recuperação para o composto estudado. A fibra de polidimetilsiloxano foi escolhida para a extração de pendimetalina.



**Figura 25:** Resultado obtido da otimização para o tipo de fibra para a extração da pendimetalina.

### 5.2.1.2 Modo de extração

A seleção do modo de extração (headspace ou modo direto) foi baseada na composição da matriz da amostra, volatilidade do analito e sua afinidade pela matriz (PAWLISZYN, 1999). Observou-se que no modo direto os resultados de extração foram melhores que o modo headspace para a pendimetalina (**Figura 26**). Assim o modo direto de extração foi escolhido para o experimento.

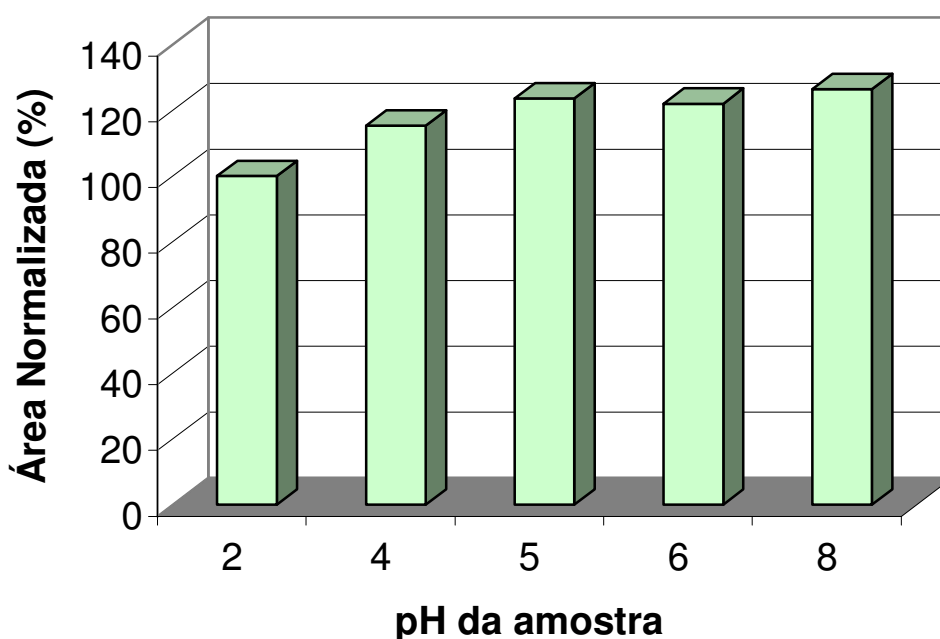


**Figura 26:** Resultados obtidos da otimização para o modo de extração

### 5.2.1.3 Influência do pH

O ajuste de algumas características físico-químicas da matriz pode afetar significativamente a eficiência e repetitividade das extrações. Dentre os parâmetros que promovem uma modificação das condições da amostra, a influência do pH da amostra tem grande importância deve-se tomar cuidado com extremos de pH (menor que 2 e maior que 11) podem danificar o recobrimento da fibra. BOYD-

BOLAND et al. (1995) estudaram a influência do pH na extração de nitroanilinas e observaram que melhores resultados encontrados para pH variaram de 4 a 11, sendo que os resultados obtidos (**Figura 27**) estão de acordo quanto à faixa de pH 4 a 8 estudada.



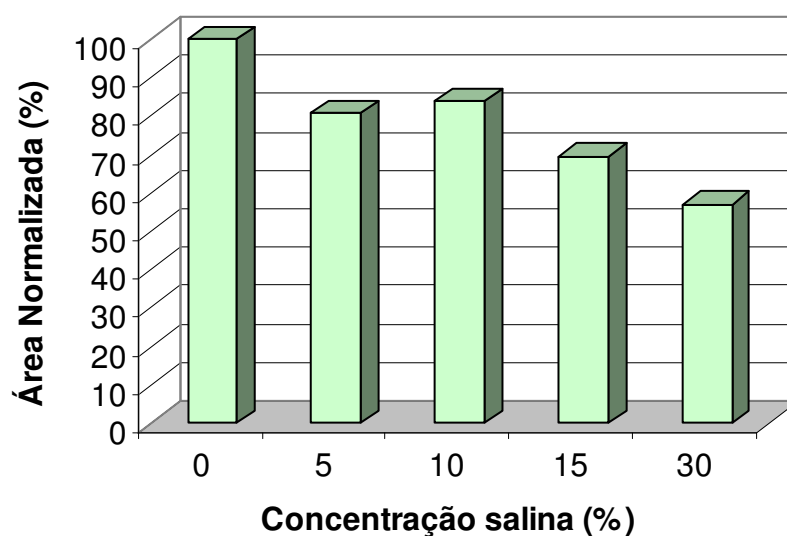
**Figura 27:** Resultado obtido da otimização do pH da amostra.

#### 5.2.1.4 Influência da adição de sal

Foi observado que ao aumentar a concentração de sal na amostra, ocorreu uma diminuição da quantidade de pendimetalina extraída (**Figura 28**). BOYD-BOLAND e PAWLISZYN (1995) também observaram que a eficiência das dinitroanilinas diminuiu com o aumento da força iônica. Desta maneira a extração da pendimetalina foi realizada sem a adição de sal na amostra

O efeito da adição de sal depende da polaridade do analito, da concentração do sal e da matriz da amostra (HERNANDO et al., 2002). Geralmente quando se

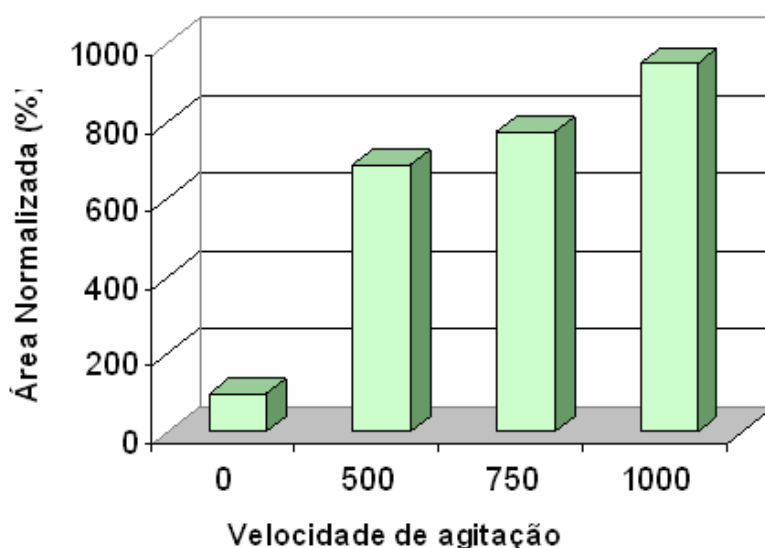
ajusta à força iônica de uma solução aumenta a eficiência de extração dos analitos, no entanto em alguns casos quando se envolve analitos altamente polares ou passíveis de sofrer dissociação iônica em meio aquoso, o aumento da força iônica pode diminuir a eficiência da extração (OLIVARES, 2006).



**Figura 28:** Resultado obtido da otimização para a influência da concentração salina na extração da amostra.

#### 5.2.1.5 Velocidade de agitação da amostra

Para comprovar a influência da agitação da amostra na eficiência da extração é observado na **Figura 29** o incremento da difusão dos analitos da matriz da amostra para a fibra extratora. Com o aumento da agitação é alcançado o estado de equilíbrio mais rapidamente (OLIVARES, 2006).



**Figura 29:** Resultado obtido da otimização para a velocidade de agitação(g) da amostra.

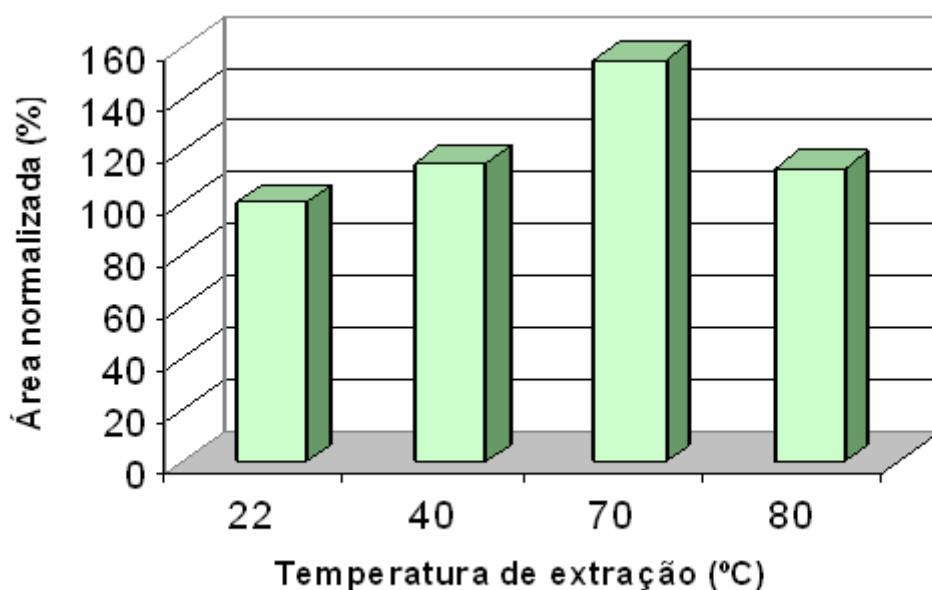
Embora o tempo de equilíbrio progressivamente decresça com o aumento da taxa de agitação, agitações muito rápidas tendem a serem incontroláveis e a velocidade rotacional pode levar a medida pouco precisa (KATAOKA et al., 2000). Assim, foi definida a velocidade de 750 g para a otimização dos próximos parâmetros.

#### 5.2.1.6 Temperatura da amostra

Este estudo mostrou (**Figura 30**) que ocorreu um aumento da extração de até atingir a temperatura de 70°C e após essa temperatura começou a ser verificada uma queda na extração de pendimetalina. Resultado semelhante é observado por GUAN et al. (1998) onde foi observada uma diminuição na eficiência de extração a



partir de 70°C quando analisadas amostras de sangue e 90°C quando analisado amostras de água. Assim verifica-se que um tempo excessivo de extração a uma temperatura alta pode levar a perda do analito. Isso porque o processo de absorção dos analitos pela fibra é um processo exotérmico e altas temperaturas podem diminuir a quantidade extraída.

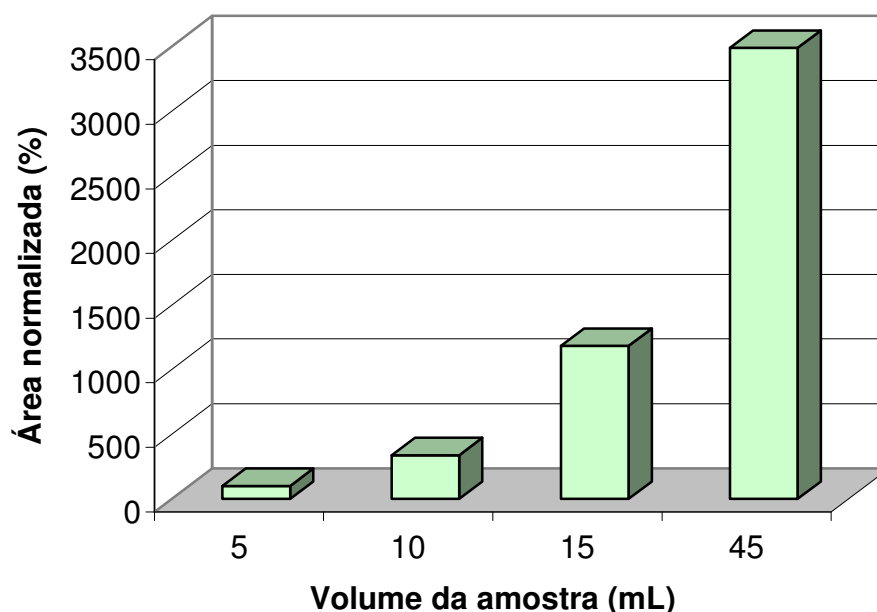


**Figura 30:** Resultado obtido da otimização para a temperatura de extração da amostra.

#### 5.2.1.7 Volume da amostra

A **Figura 31** mostra a eficiência de extração para volumes da amostra estudados. Geralmente, a quantidade de analito absorvida na fase estacionária aumenta quando o volume da amostra aumenta consequentemente à sensibilidade também aumenta (KRUTZ et al., 2003). Segundo GONZÁLEZ-BARREIRO et al.,

(2000) em um estudo onde os volumes foram otimizados os melhores volumes encontrados ficaram entre 4 a 120 mL (GONZÁLEZ-BARREIRO et al., 2000).

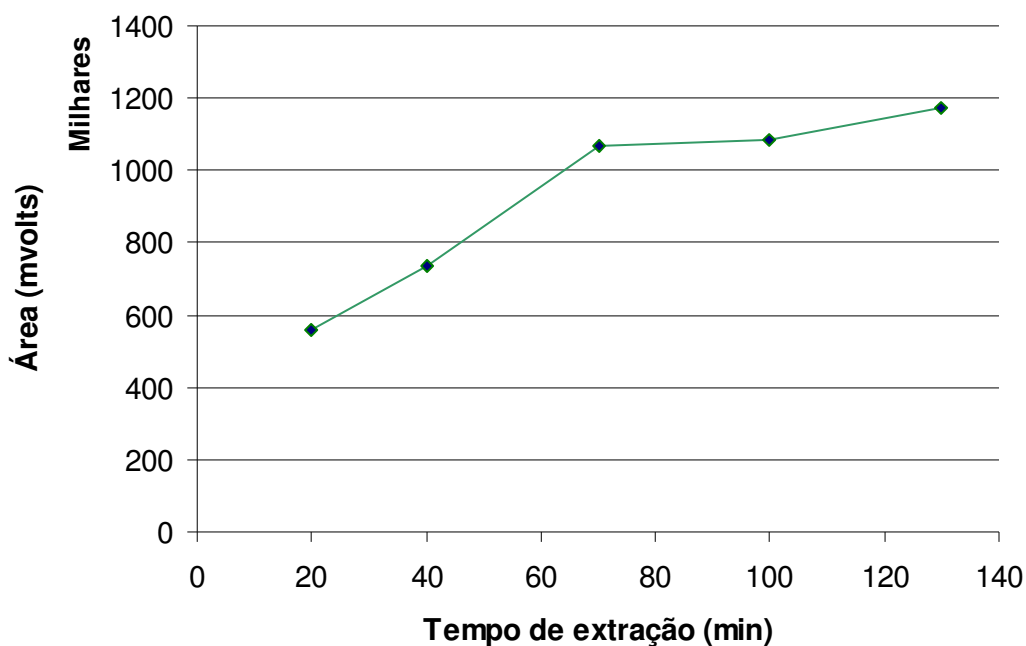


**Figura 31:** Resultado obtido da otimização para o volume da amostra.

#### 5.1.1.8 Tempo de extração

O tempo de extração é otimizado para determinar o tempo requerido para um analito atingir o equilíbrio entre a matriz da amostra e a fase estacionária (KRUTZ et al., 2003). Assim para estabelecer um perfil da extração foram avaliados os tempos de extração de 20, 40, 70, 100 e 130 min. Na **Figura 32** pode ser observada a eficiência da extração durante a faixa de tempo estudada. Para alguns compostos o tempo necessário para estabelecer o equilíbrio é longo, nesse caso embora a SPME tenha uma sensibilidade máxima neste ponto o equilíbrio completo não é

necessário devido à relação linear entre a quantidade de analito extraído pela fibra e a concentração inicial na amostra em condições de não-equilíbrio (OLIVARES, 2006). Deve-se tomar cuidado para que a exposição da fibra à amostra seja precisa, fornecendo resultados repetíveis (PROZEN et al., 1999)



**Figura 32:** Resultado obtido da otimização para o tempo de extração da amostra.

#### 5.1.1.9 Tempo de dessorção

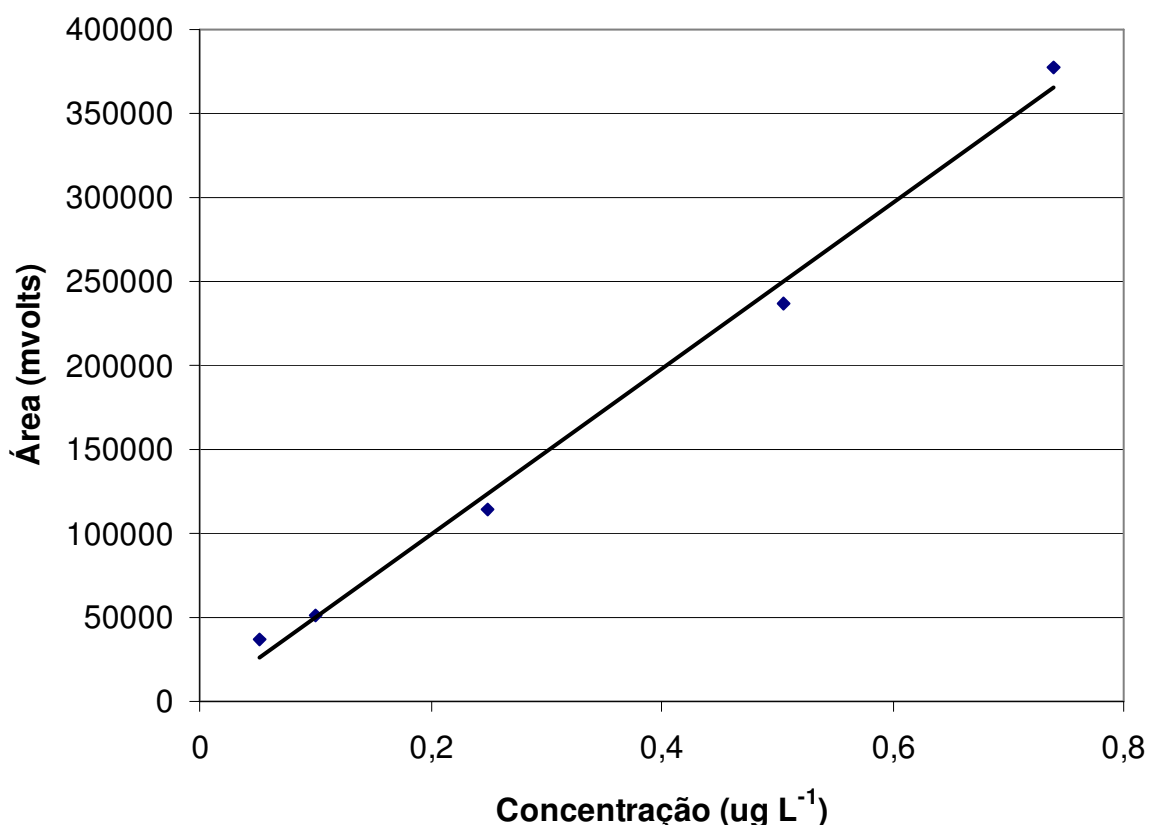
Após a extração, os analitos foram transferidos para o cromatografo onde ocorreu a dessorção, separação e quantificação. O estudo do tempo de dessorção foi realizada na temperatura de 270°C e avaliado nos tempos de dessorção de 3 e 5 minutos. A fibra foi injetada por três corridas consecutivas. Foi verificado que a pendimetalina foi rapidamente removida da fibra e transferida para a coluna cromatográfica. Quando avaliado o tempo de 3 minutos de dessorção, foi observado que na segunda injeção da fibra por mais 3 minutos encontrou-se uma área residual

de 0,22% na terceira de 0,11% da área obtida na primeira injeção. Para o tempo de dessorção de 5 minutos, observou uma área percentual de 0,16% para a segunda corrida e após a terceira corrida não foi observada área residual. Portanto ambos os tempos podem ser usados para a dessorção, pois apresentaram áreas residuais menores que 10%. Foi otimizado o tempo de 5 minutos para o tempo de dessorção das análises seguintes.

### 5.2.2 Validação da metodologia

Após a otimização de todos os parâmetros a metodologia, ficou definida como: extração no modo direto; fibra polidimetilsiloxano (PDMS); amostra ajustada para pH 8; sem adição de sal; volume de 15 mL; temperatura de extração 70°C; velocidade de agitação 750 g; tempo de extração 40 minutos. A partir da metodologia padronizada foi realizada a validação do método. Foram estudados os parâmetros linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), recuperação e repetitividade.

A faixa linear encontrada em água de rio de 0,05 a 0,74  $\mu\text{g L}^{-1}$  (**Figura 33**). O coeficiente angular e linear foram respectivamente 493324 e 585,84 sendo o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,9938. Na literatura são encontradas faixas lineares para pendimetalina na faixa de 0,1 - 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  em amostras de água por SPME (GUAN et al., 1998) e faixa de 0,025 – 0,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  em água por SPE (BRUZZONITI et al., 2006).



**Figura 33:** Curva analítica obtida para o herbicida pendimetalina

Neste trabalho foram encontrados valores de LOD e LOQ para a pendimetalina de 0,02 e 0,06  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. São encontrados valores de LOD em água utilizando a técnica de SPME de 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  por GC-ECD (GUAN et al., 1998), 0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$  usando detector - NPD e 0,0001  $\mu\text{g L}^{-1}$  por detector de MS (BOYD-BOLAND et al., 1995). BRUZZONITI et al. (2006) encontrou LOQ de 0,010  $\mu\text{g L}^{-1}$  em amostras de água utilizando a técnica de SPE.

Os resultados obtidos para a recuperação para pendimetalina estão na **Tabela 11**. Os valores foram na faixa de  $86,2 \pm 11,5\%$  e  $103,4 \pm 9,5\%$  nas duas matrizes estudadas.

A técnica de SPME no modo de extração direto apresentou resultados melhores que os valores encontrados na literatura. São encontrados valores de

recuperação para pendimetalina em água através da técnica de SPME no modo headspace de  $58 \pm 8,3$  % concentração de  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e de  $59 \pm 5,1\%$  para a concentração de  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  (GUAN et al., 1998) e recuperação de 86,8% e teor de  $0,025 \mu\text{g L}^{-1}$  usando a técnica de SPE com cartuchos C18 (BRUZZONITI et al., 2006)

**Tabela 11:** Valores de recuperação (%) obtidos através de SPME em amostras de água de rio e água de torneira.

Matriz	Recuperação				
	Concentração		DS	%	DPR
	teórica	exp <sup>a</sup>			(%)
Água	0,18	0,18	0,03	97,7	9,6
torneira	0,37	0,38	0,04	103,4	9,5
Água	0,18	0,16	0,02	86,2	11,5
de rio	0,37	0,38	0,06	102,3	16,1

<sup>a</sup> concentração experimental

A precisão foi avaliada através da repetitividade ( $n=5$ ) nas concentrações de  $0,18$  e  $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo encontrado valores de DPR entre 14,6 e 15,3%, respectivamente. Esses valores podem ser considerados aceitáveis, pois estão abaixo do valor máximo de 20% definido para testes de repetitividade (RIBANI et al., 2004).). Valores de DPR de 7,7 a 12% utilizando SPME foram obtidos por GUAN et al. (1998).

A pendimetalina poder ser detectada por extração em fluido supercrítico (GONÇALVES et al., 2006), por SPE (BRUZZONITI et al., 2006), por SPME (GUAN

et al., 1998; BOYD-BOLAND et al., 1995) e LLE (KISHIMBA et al., 2004), ainda são poucos os trabalhos analíticos encontrados na literatura, para determinação de este herbicida utilizando a técnica de SPME em água.

### 5.2.3 Amostras coletadas

Foram analisadas 82 amostras de água superficiais, coletadas nos rios Amola Faca, Jundiá, Itoupava e Manoel Alves. As amostras foram analisadas de acordo com a metodologia otimizada e validada anteriormente (**Tabela 12**).

**Tabela 12:** Número de amostras detectadas e não detectado com pendimetalina por rio estudado.

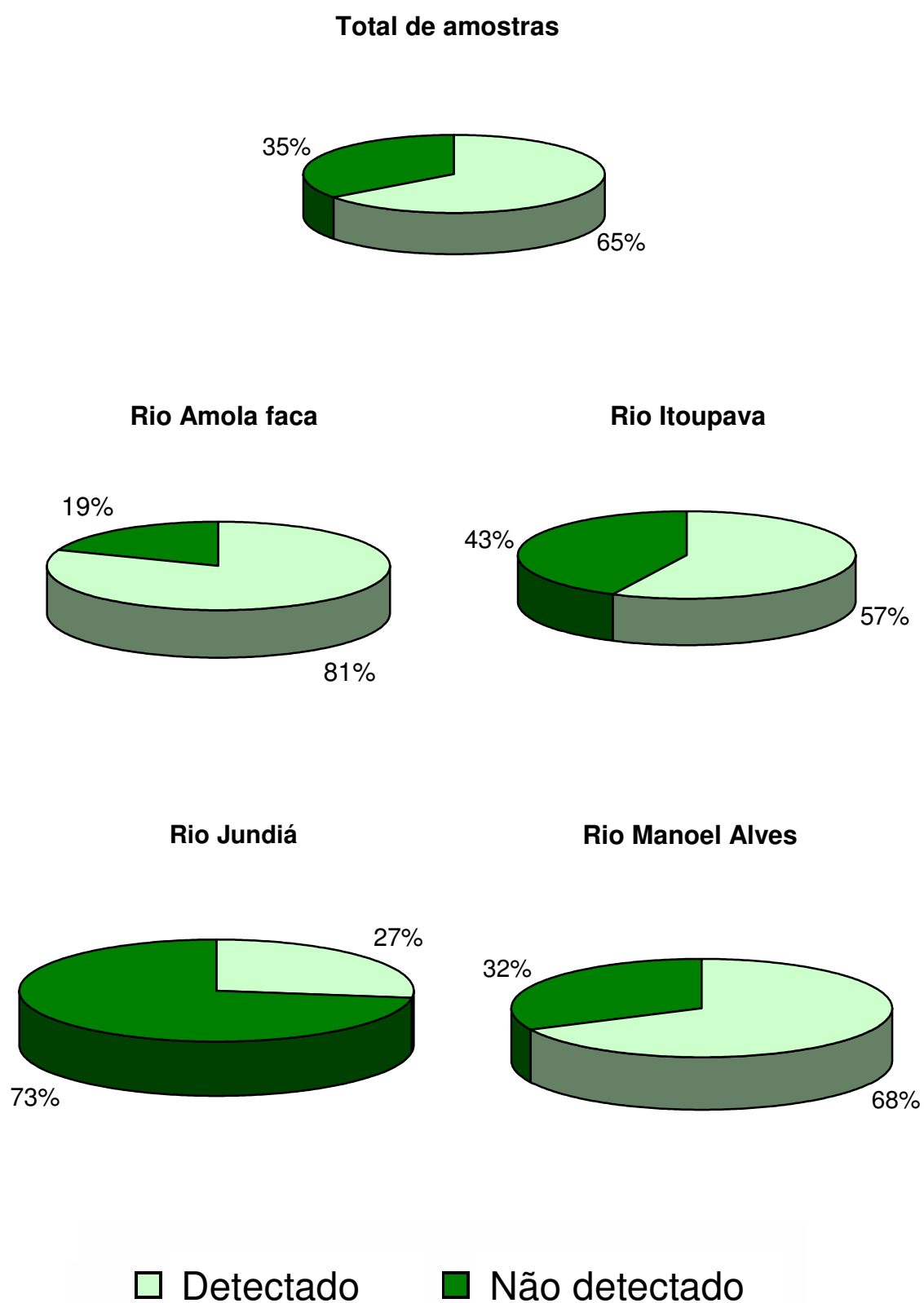
Rio	Amostras		
	Coletadas	Detectado	Não detectado
Amola Faca	26	21	5
Itoupava	14	8	6
Jundiá	11	3	8
Manoel Alves	31	21	10
<i>Total</i>	82	53	29

Na **Tabela 12** e **Figura 34** mostra o número amostras contaminadas pelo herbicida pendimetalina (53) e a porcentagem (65%) do total de amostras analisadas e os teores encontrados. Sendo que foram encontrados teores que variaram de 0,06 a 0,38  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As porcentagens de contaminações encontradas

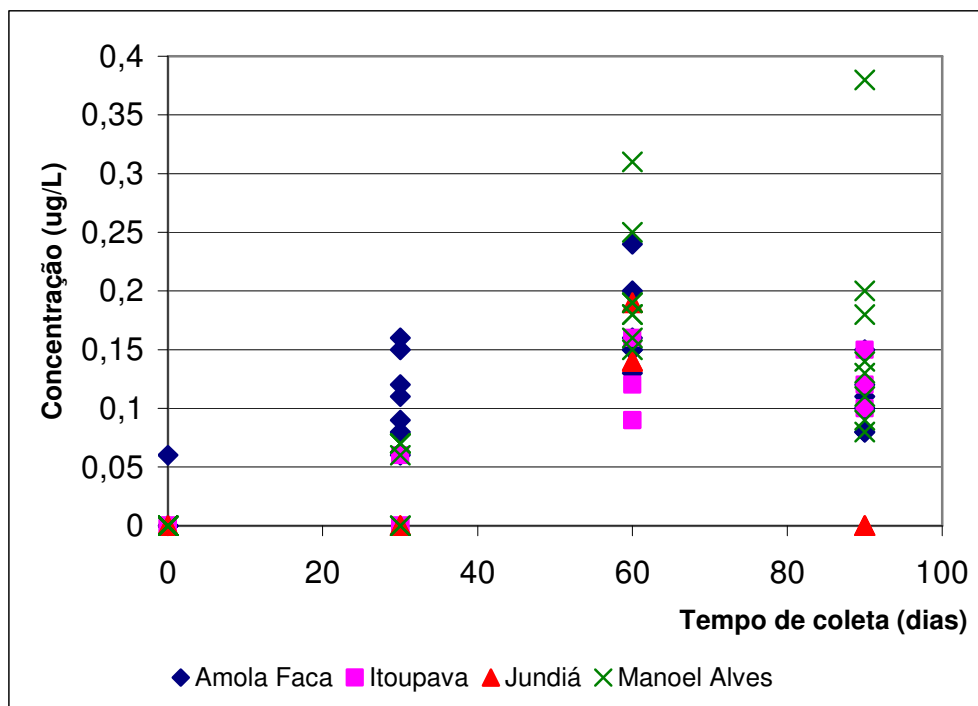
nos rios: Amola Faca (81%), Itoupava (57%), Jundiá (27), Manoel Alves (68%), e os teores encontrados variaram de 0,06 a 0,24; 0,06 a 0,16; 27 0,14 a 0,19; e de 0,06 a 0,38  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente.

Na terceira e quarta coleta ocorreu um aumento nas contaminações das amostras por pendimetalina, sendo os teores encontrados pouco mais elevados, e que variaram de 0,09 a 0,31  $\mu\text{g L}^{-1}$  no mês de abril e 0,08 a 0,38  $\mu\text{g L}^{-1}$  no mês de maio. A menor contaminação encontrada ocorreu na primeira (uma) e segunda coleta (12) e os teores variaram de 0,06 a 0,16  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Na **Figura 35** observa-se o comportamento da pendimetalina com relação os teores encontrados nos quatro rios e nas quatro coletas. Rios: Amola Faca, Itoupava, Jundiá e Manoel Alves, enquanto na **Figura 37** é observado a concentração média de amostras contaminadas por coleta realizada.

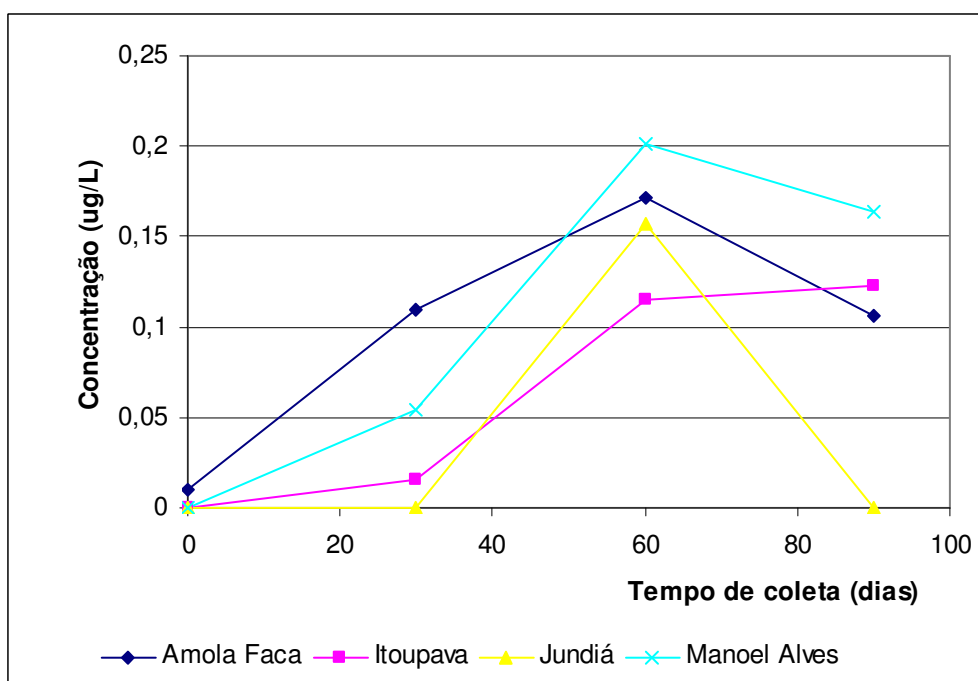




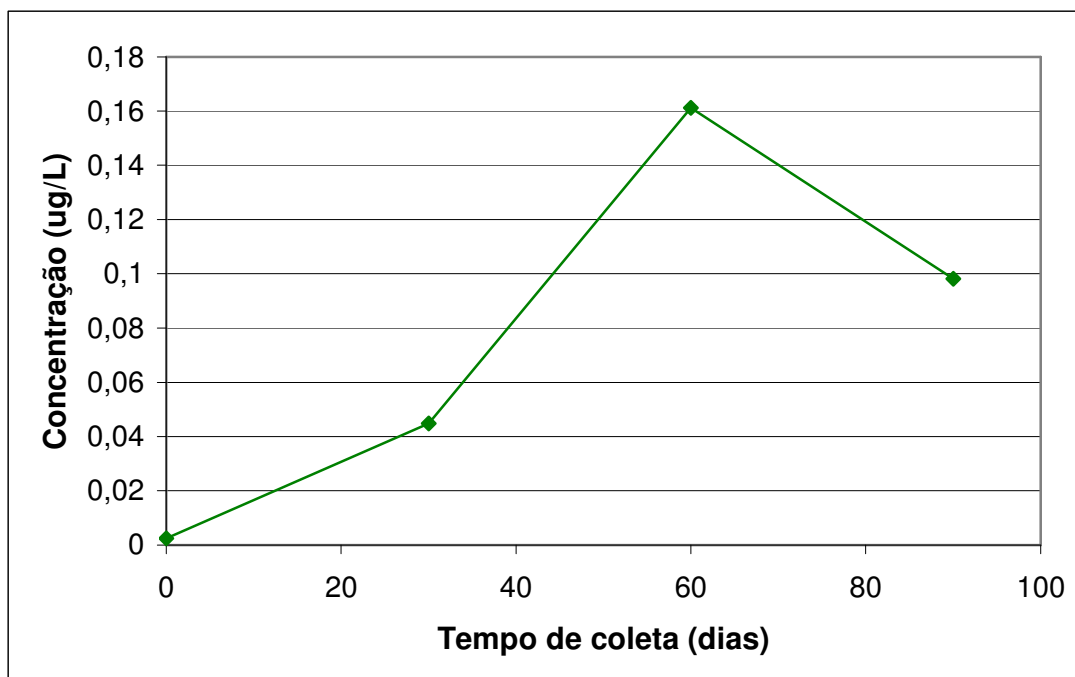
**Figura 34:** Porcentagem das amostras detectadas e não detectadas por pendimetalina nos quatro rios estudados.



**Figura 35:** Distribuição das concentrações de pendimetalina em cada coleta realizada por rio: Fevereiro (0), Março (30), Abril (60) e Maio (90) de 2007.



**Figura 36:** Resultado das concentrações médias de pendimetalina por rio e coleta realizada nos meses de: Fevereiro (0), Março (30), Abril (60) e Maio (90) de 2007.



**Figura 37:** Concentração média encontrada de pendimetalina por coleta realizada, nos meses de: Fevereiro (0), Março (30), Abril (60) e Maio (90) de 2007.

Na literatura são encontradas citações para de extração de pendimetalina em amostras de água e os teores encontrados foram de:  $0,00072 \mu\text{g L}^{-1}$  (CARAFA et al., 2007), amostras de água de baía  $0,018 \mu\text{g L}^{-1}$ , neste estudo foi encontrado apenas uma amostra contaminada (LEHOTAY et al., 2004), amostras de água de lago  $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$  (CAMPER et al., 2004), amostras de água de rio  $0,32 \mu\text{g L}^{-1}$  (HOFFMAN et al., 2000), respectivamente. HOFFMAN et al. (2000) investigaram amostras de água de rio nos Estados Unidos no ano de 2000, encontraram 11% das amostras contaminadas com pendimetalina.

Quando a pendimetalina foi analisada em outras matrizes, os teores encontrados foram: amostras de solo  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (GONÇALVES et al., 2006), 0,03 a  $55 \mu\text{g g}^{-1}$  amostras de solo de lago (CAMPER et al., 2004), amostras de vinho de  $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$  (BOYD-BOLAND et al., 1995) respectivamente.

## 6. CONCLUSÃO

A otimização das variáveis que influenciaram a extração dos analitos possibilitou obter as melhores condições para formar uma metodologia eficiente para a determinação de alaclor, atrazina, propanil e pendimetalina em águas superficiais, por microextração em fase sólida - SPME.

A técnica de SPME-GC-ECD apresentou bons resultados analíticos, quanto à linearidade, limite de detecção e extração dos analitos em ambos os trabalhos realizados. Os limites de detecção encontrados foram baixos o suficiente para permitir a detecção destes compostos ao nível de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Concentração máxima admissível definida pela EC para a presença de qualquer pesticida em águas destina ao consumo humano, sem tratamento prévio.

No período de fevereiro a maio de 2007 os herbicidas alaclor, propanil e pendimetalina estavam presentes nos quatro rios: Amola Faca, Itoupava, Jundiá e Manoel Alves, e os teores variaram de 0,07 até  $1,72 \mu\text{g L}^{-1}$ .

O herbicida propanil estava presente em 80% das amostras analisadas e os teores variaram de 0,02 a  $1,69 \mu\text{g L}^{-1}$ . A atrazina não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas durante as quatro coletas realizadas.

Quanto à pendimetalina 65% das amostras dos quatro rios apresentaram contaminação e os teores variaram de 0,06 a  $0,38 \mu\text{g L}^{-1}$ .

O rio Amola Faca foi o que apresentou maior número de amostras contaminadas, seguido por Manoel Alves, Itoupava e Jundiá, respectivamente.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos de Medicamentos. Resolução 899, de 29 de maio de 2003.

AGUILAR, C. et al. Determination of pesticides in environmental water by solid-phase extraction and gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. **Journal Chromatography A**, v. 771, p. 221-231, 1997.

ALMEIDA, C. et al. Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica. **Sociedade Portuguesa de Química**, n. 95, p. 69-77. 2004. Disponível em < <http://www.spq.pt>>. Acesso em: 10 março 2007.

ALPENDURADA, M. F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. **Journal Chromatography A**, v. 889, p 3-14, 2000.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-fase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v.62, n.19, p.2145-2148, 1990.

ARNALDO, W. A. **Investigation of the abiotic reduction of the herbicides trifluralin an pendimethalin**.Disponível: [water.usgs.gov/wrri/00grants/MNabiotic](http://water.usgs.gov/wrri/00grants/MNabiotic). Pdf. Acesso: jan. 2007.

ASPERGER, A. et al. On the signal response of various pesticides in electrospray and atmospheric pressure chemical ionization depending on the flow-rate of eluent applied in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 937, p. 65-72, 2001.

AUGUSTO, F; VALENTE, A. L. P. Applications of solid-phase microextraction to **chemical** analysis of live biological samples. **Trac Trendes in Analitical Chemistry**, v.21 n.6-7, p.428-438, 2002.

AUGUSTO, F. Análise de óleos essenciais por Análise de óleos essenciais por SPME. Disponível em <[http://www.iac.sp.gov.br/sboe2005/ FabioAugusto.pdf](http://www.iac.sp.gov.br/sboe2005/FabioAugusto.pdf)>. Acesso em: 16 julho 2007.

AZEVEDO, Fausto Antonio de Azevedo; CHASIN, Alice A. da Matta. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003. 340 p.

BARCELÓ, D. et al. Sampling of polar pesticides from water matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 338, p. 3-18, 1997.

BAGHERI, H. et al. Immersed solvent microextraction and gas chromatography-mass spectrometric detection of s-triazine herbicides in aquatic media. **Analytica Chimica Acta**, v. 537, p. 81-87, 2005.

BERNHARDT, A. et al. Determination of herbicides in stemflow and throughfall of beeches (*Fagus Sylvatica* L.) and in rainfall. **Chemosphere**, v. 57, p. 1563-1570, 2004.

BELTRAN. J. et al. Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. **Journal Chromatography A**, v. 885, p.389-404, 2000.

BIZIUK, M. et al. Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. **Journal of Chromatography, A**, v. 754, p. 103-123, 1996.

BOSSI, R. et al. Analysis of polar pesticides in rainwater in Denmark by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v. 957, p. 27-36, 2002.

BOUAID, A. et al. Solid-phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in soil samples by gas chromatography. **Journal Chromatography A**, v. 939, p. 13-21, 2001.

BOYD-BOLAND A. A. et al. Solid-phase microextraction of nitrogen-containing herbicides. **Journal of chromatography A**, v. 704, p. 163-172, 1995.

BRASIL. Lei 7802, de 11/07/1989. Dispõe sobre a pesquisa, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Legislação Federal de Agrotóxicos e afins, Brasília, Ministério da Agricultura, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova normas e o padrão de Potabilidade da Água destinada ao Consumo Humano, a serem observados em todo o território nacional. Portaria nº. 36, de 19 de janeiro de 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Ratifica os termos das "diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 09/12/1991". Portaria nº 03 de 16 de janeiro de 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde da República Federativa do Brasil. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria 518 do, 25 de março de 2004. Publicado no Diário Oficial da União de 26 de março 2004.

BROWER, E. R. et al. Selected procedures for the monitoring of polar pesticides and related microcontaminants in aquatic samples. **Journal Chromatography A**, v. 703, n. 1-2, p. 167-190, 1995.

BRUZZONITI, M. C. et al. Determination of herbicides by solid phase extraction as chromatography-mass spectrometry in drinking waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 578, p. 241-249, 2006.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R. et al. Evaluation of surface- and ground-water pollution due to herbicides in agricultural areas of Zamora and Salamanca (Spain). **Journal Chromatography A**, v. 869, p. 471-480, 2000.

CAMPANHOLA, C. et al. Evolução, situação atual, projeção e perspectiva de sucesso de um programa de racionalização do uso de agrotóxicos no Brasil. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE RACIONALIZAÇÃO DO USO DE PESTICIDA NO CONE SUL. 1997, Campinas.

CAMPER, N. D. et al. Herbicide levels in nursery containment pond water and sediments. In: Strandberg, M. et al. Effects of pendimethalin at lower trophic levels - a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 190-201, 2004.

CANCHO, B. et al. Determination of aldehydes in drinking water using pentafluorobenzylhydroxylamine derivatization an solid-phase microextraction. **Journal Chromatography A**, v. 943, p. 1-13, 2001.

CARABIAS–MARTÍNEZ, R. et al. Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography Evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters. **Journal Chromatography A**, v. 950, p. 157-166, 2002.

CARABIAS–MARTÍNEZ, R. et al. Solid-phase extraction and sample stacking-micelar electrokinetic capillary chromatography for the determination of multiresidues of herbicides and metabolites. **Journal of chromatography A**, v. 990, p. 291-302, 2003.

CARABIAS –MARTÍNEZ, R. et al. Determination of herbicides, including thermally labile phenylureas, by solid-phase microextraction and gás chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1002, p. 1-12, 2003.



CARAFÀ, R. et al. Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic). **Chemosphere**, 2007. In press.

CASAS, V. et al. Multivariate optimization of the factors influencing the solid-phase microextraction of pyrethroid pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1124, n. 1-2, p. 148-156, 2006.

CÁSSIA, R. et al. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado cultivo de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 22, p. 58-64, 1999  
CEREJEIRA, M, J. et al. Pesticides in Portuguese surface and ground water. **Water Research**, v. 37, p. 1055-1063, 2003.

COUTINHO, C. et al. Mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Ecotoxicol e meio ambiente**, Sobre a técnica de SPME Conclui-se que a técnica de SPME: v.15, p.65-72, 2005

CORREIA, M. et al. Multi-residue methodology for pesticide screening in wines. **Journal Chromatography A**, v. 889, p. 59-67, 2000.

DUGAY, J. et al. Effect of the various parameters governing solid-phase microextraction for the trace-determination of pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 795, p. 27-42, 1998.

DRINKING WATER DIRECTIVE (80/778/EEC). Disponível em <<http://rod.eionet.europa.eu/show.jsv?id=218&mode=S>>. Acesso em: 24 maio 2007.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUARIA E EXTENSAO RURAL DE SANTA CATARINA S.A (EPAGRI). **Fonte:** dados pluviométricos Epagri/Ciram, agosto 2007.

ETO, M. **Organophosphorus pesticides**: organic and biological chemistry. Cleveland, Ohio: CRC, 1977. 387 p.

ETN. Extension Toxicology Network. **Pesticide Information Profiles**. Disponível em: <http://extoxnet.orst.edu/pips/pip>. Acesso: 05 Mar.2007.

FARIA L. J. S. **Avaliação de diferentes Sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia**. 2004. 61f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de química, Campinas, 2004.

GARCIA, E. G. et al. **Segurança e saúde no trabalho rural**: a questão dos agrotóxicos. São Paulo: Fundacentro, 2001. 16 p.

GOOGLE EARTH. Disponível em <<http://www.earthgoogle.com>>. Acesso em: 03 julho 2007.

GONZÁLEZ-BARREIRO, C. et al. Optimisation of alachlor solid-phase microextraction from water samples using experimental design. **Journal Chromatography A**, v. 896, p. 373-379, 2000.

GONÇALVES, C. et al. Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters, using solid-phase microextraction-gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection. **Journal Chromatography A**, v. 968, p. 177-190, 2002.

GONÇALVES, C. et al. Optimization of supercritical fluid extraction of pesticide residues in soil by means of central composite design and analysis by gás chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1110, p. 6-14, 2006.

GUAN F. et al. Headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic determination of dinitroaniline herbicides in human blood, urine and environmental water. **Journal of chromatography B**, v. 714, p. 205-213, 1998.

HADLICH, G. M. **Cartografia de riscos de contaminação hídrica por agrotóxicos: proposta de avaliação e aplicação na microbacia hidrográfica do córrego Garuva, Sombrio-SC**. 1997. 170. f.. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 1997.

HERNANDO A. M. P. **Aplicación de la microextracción em fase sólida al análisis medioambiental**. 2002. 310 f.. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, 2002.

HILEMAN, B. Environmental estrogens linked to reproductive abnormalities, cancer. [Chemical & Engineering News](#), v. 72, n. 5, p. 19-23, 1994.

HOU, L. et al. Automated hollow fiber-protected dynamic liquid-phase microextraction of pesticides for gas chromatography-mass spectrometric analysis. **Journal Chromatography A**, v. 985, p. 107-116, 2003.

HOFFMAN, R. S. et al. Comparison of pesticides in eight U.S. urban streams. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 2249-2258, 2000.

SÍNTESE ANUAL DA AGRICULTURA DE SANTA CATARINA (ICEPA). Produtividade e índice de produtividade de arroz irrigado produzido em Santa Catarina. 2005.

ISENSE, A. R. Movement of herbicides in terrestrial and aquatic environments, In: PIMENTEL, D. **CRC Handbook of pest: Management in agriculture**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, v. 1, p. 651-659, 1991.

INSTITUTO RIOGRANDENSE DO ARROZ (IRGA). Lavoura Arrozeira Gaúcha: Perfil do Sistema Produtivo. Porto Alegre-RS, 1996.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Disponível em <<http://www.inmetro.gov.br>>. Acesso em: 04 julho 2007.

JAVARONI, R. C. A. et al. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 1, p. 58-64, 1999.

KATAOKA, H. et al. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal Chromatography A**, v. 880, p. 35-62, 2000.

KONSTANTINOOU, I. K. et al. The status of pesticides pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. **Environmental Pollution**, v.141, p. 555-570, 2006. KISHIMBA, M. A. et al. H. The status of pesticide pollution in Tanzânia. **Talanta**, v. 64, p. 48-53, 2004.

KOMATSU, E. et al. Otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduo de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 720-724, 2004.

KRUTZ L. J. et al. Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental sample. **Journal of chromatography A**, v. 999, p. 103-121, 2003.

LAMBROPOULOU, D. A. et al. Determination of fungicides in natural waters using solid-phase microextraction and gas chromatography coupled with electron-capture and mass spectrometric detection. **Journal of chromatography A**, v. 893, n. 1, p. 143-156, 2000.

LAMBROPOULOU, D. A. et al. Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in natural water. **Journal Chromatography A**, v. 922, p.243-255, 2001.

LAMBROPOULOU, D.A. et al. Application of solid-phase microextraction in the monitoring of priority pesticides in the Kalamas River (N.W. Greece). **Journal Chromatography A**, v. 963, p. 107-116, 2002.

LARA, W. H. et al. Pesticidas, **Química Nova**, v. 15, n. 2, p.161-166, 1992.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Manole, 1999. 230 p.

LAABS, V. et al. Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the Northeastern Pantanal Basin, Brazil. [Journal of Environmental Quality](#), v.31, p. 1636-1648, 2002.

LAABS, V. et al. Leaching and degradation of corn and soybean pesticides in the soil of the Brazilian cerrado. **Chemosphere**, v. 41, p. 1441-1449, 2002.

LANÇAS, Fernando M. **Extração em Fase sólida**. São Carlos: RiMa, 2004. 96 p.

LANÇAS, Fernando M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 46 p.

LEHOTAY, S.J. et al. Agricultural pesticide residues in oysters and water from two Chesapeake Bay tributaries. In: Strandberg, M. et al. Effects of pendimethalin at different trophic levels - a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 190-201, 2004.

LEITE, Flávio . **Validação em análise química**. Campinas, SP: Átomo, 2002. 278 p.

LI, H. et al. Determination of organochlorine pesticides in water using microwave assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1012, p. 129-137, 2003.

LORD, H. et al. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 153-193, 2000.

LÓPEZ-BLANCO, M.C. et al. Application of single-drop microextraction and comparison with solid-phase microextraction and of  $\beta$ -endosulfan in water samples by gas chromatography-electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 984, p. 245-252, 2003.

MAGDIC, S. et al. Analysis of organochlorine pesticides using solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 723, p. 111-122, 1996.

MARQUES, J. F. Pesticidas na água potável: padrões de qualidade e princípio de precaução na Legislação Européia. **Caderno CRH**, Salvador, n. 24-25, p. 269-285, 1996.

MORASSO, G. et al. Pesticides as food contaminants: a pilot Project for correct public information. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 9-10, p. 379-382, 2000.

MARTINEZ et al. Biodegradação do herbicida Propanil por fungo isolado da rizosfera de arroz. **Pesticida Ecotoxicol e meio ambiente**, v.15, p.113-121, 2005.

McFARLAND, J. E. Hormone disrupters, environmental estrogens, and pesticides. 1996. Disponível em: <<http://www.vtpp.ext.vt.edu:1080/enest2jm.html>> Acesso em: 01 junho 2007.

MOTOLESY, G.; NADASY, M.; ANDRISKA, V. **Pesticide Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1988. 9 p.

MUÑOZ DE LA PEÑA, A. et al. Monitoring of phenylurea and propanil herbicides in river water by solid-phase-extraction high performance liquid chromatography with photoinduced-fluorimetric detection. **Talanta**, v. 60, p. 279-285, 2003.

MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE. Conselho Nacional do Meio ambiente-CONAMA. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Resolução N° 357, de 17 de março de 2005.

NATANGLEO, M. et al. J. Chromatogr. A, v. **859**, p. 193, 1999. In: ZHAO, E. et al. Determination of the chloracetanilide herbicides in waters using single-drop microextraction and gas chromatography. **Microchemical journal**, n. 83, p. 105-110, 2006.

OLIVARES, I. R. B. **Desenvolvimento, otimização e validação da técnica HS-SPME – GC/MS para análise de amostras obtidas do Rio Atibaia através da aplicação de uma sistemática “ISO” para diagnóstico ambiental de áreas contaminadas.** 2006. 190 f.. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Carlos, 2006.

PAWLISZYN, J. New directions in sample preparation for analysis of organic compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 113-122, 1995.

PAWLISZYN, Janusz. **Solid Phase Microextraction: Theory and Practice.** New York: Wiley-VCH. 1997.

PAWLISZYN, Janusz. **Applications of Solid Phase Microextraction.** Ontário: Royal Society of Chemistry. 1999. 655 p.

PRIMEL, E.G. et al. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo de arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Predicação teórica e monitoramento. **Química. Nova**, v. 28, n.4, p. 605-609, 2005.

PERES, Frederico; MOREIRA, Josino Costa. **É veneno ou remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003. 384p.

PIMENTEL, D. et al. Pesticides: amount applied and amounts reaching pests. In: PIMENTEL, D. **CRC Handbook of pest: Management in agriculture.** 2. ed. Boca Raton. v.1, p. 741-750, 1991.

QUEIROZ, S. C. N. et al. Métodos de Extração e/ou Concentração de Compostos encontrados em Fluidos Biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química. Nova**, v. 24, n.1, p. 68-76, 2001.

QUEIROZ, S. C. N. **Determinação de multirresíduos de pesticidas em água por cromatografia líquida de alta eficiência com ênfase em detecção por espectrometria de massas e novos sorventes para extração em fase sólida.** 2001. 153 f.. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de química, Campinas, 2001.

RAMSEH, A. et al, J. Environ. Monit., **v. 3** p. 505, 2001. In:  
ZHAO, E. et al. Determination of the chloracetanilide herbicides in waters using single-drop microextraction and gas chromatography. **Microchemical journal**, n. 83, p. 105-110, 2006.

PROZEN, H. et al. Solid Phase Microextraction. **Trends Analytical Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 272-282, 1999..ROCHA, C. et al. Determination of trace triazine and chloroacetamide herbicides in tile-fed drainage ditch water using solid-phase microextraction coupled with GC-MS. **Environmental Pollution**, 2007. In press.

RESGALA JUNIOR, C. et al. Toxicidade Aguda de herbicidas e inseticida utilizados na cultura do arroz irrigado sobre juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 59-68, 2002.

Ribani, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 2, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, M.L. et al. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas : avaliação preliminar. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 688-694, 2007.

RISSATO, S. R. et al. Development of a Supercritical Fluid extraction Method for simultaneous determination of Organophosphorus, Organohalogen, Organonitrogen and pyrethroids pesticides in fruit and vegetable and its Comparison with a Convencional Method by GC-ECD and GC-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 5, p. 1038-1047, 2005.

ROCHA, C. et al. Determination of trace triazine and chloroacetamide herbicides in tile-fed drainage ditch water using solid-phase microextraction coupled with GC-MS. **Environmental Pollution**, 2007. In press.

SANCHEZ-PRADO, L. et al. Application of solid-phase microextraction to the study of the photochemical behaviour of five priority pesticides: “on-fiber” and aqueous photodegradation. **Jounal of Chromatography A**, v. 1047, p. 271-279, 2004.



SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE AGROTÓXICOS (SIA). Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/sia.htm>>. Acesso em: 24 maio 2007.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE E ENDEMIAS (SUCEN). Disponível em <<http://www.sucen.sp.gov.br>>. Acesso em: 08 julho 2007.

SUPELCO. **SPME applications Guide**. Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/8700/8652.pdf>> Acesso em: 03 julho 2007.

SHULING S. et al. Multi-residue determination method of pesticides in leek by gel permeation chromatography and solid phase extraction followed by gas chromatography with mass spectrometric detector. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 448–453, 2007.

TOMLIN, C. D. S. (ed) **The pesticide manual: a world compendium**. 12<sup>th</sup> ed. Surrey: British.Crop Protection.Council, 2000, 1250 p.

TUNDISI, JOSE GALIZIA. **Água no século XXI: Enfrentamento a Escassez**. São Carlos: RiMa, 2003. 248 p.

VALENTE, A.L.P. et al. Microextração por Fase Sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VETTORAZZI, G.; RADAELLI - BENVENUTTI, B. M. **International regulatory aspects for pesticides Chemicals**. v. 2. Boca Raton: CRC Press, 1982.

WAUCHOPE, R. D. Pesticides in runoff: measurement, modeling, and mitigation. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 31, n. 3, p. 337-344, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Principles for safety assessment of food additives and contaminants in food. Geneva: WHO, 1987. (Environmental Health Criteria, 70).

WSSA. Weed Science Society of América. **Herbicide Handbook** 7<sup>th</sup> ed. Champaign, 1994. 10-59. p.

ZOMBOLIM, L.; ZUPPI DA CONCEIÇÃO, M.; SANTIAGO, T.O. **O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**. Viçosa: UFV. 2003, 376 p.

ZHAO, E. et al. Determination of the chloracetanilide herbicides in waters using single-drop microextraction and gas chromatography. **Microchemical Journal**, n. 83, p. 105-110, 2006.